

Université de Montréal

Efficacité d'un traitement de pegbovigrastim pour prévenir l'écoulement vaginal purulent et l'endométrite cytologique chez les vaches laitières postpartum

Par
Talibé Diallo

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en
vue de l'obtention du grade de *Maîtrise* ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires, option sciences cliniques

Mars 2022

©Talibé Diallo, 2022

Ce mémoire intitulé

**Efficacité d'un traitement de pegbovigrastim pour prévenir l'écoulement vaginal
purulent et l'endométrite cytologique chez les vaches laitières postpartum**

Présenté par

Talibé Diallo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marianne Villettaz-Robichaud
Présidente-rapporteuse

Jocelyn Dubuc
Directeur de recherche

Kalidou Ndiaye
Codirecteur

Marjolaine Rousseau
Codirectrice

David Francoz
Membre du jury

Résumé

Les incidences de l'écoulement vaginal purulent (EVP) et de l'endométrite cytologique (EC) sont élevées dans les exploitations laitières à cause des contaminations utérines associées à l'immunosuppression péripartum. Le pegbovigrastim (bG-CSF) a été approuvé dans la prévention de la mammites clinique chez les vaches en postpartum. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité du bG-CSF dans la prévention de l'EVP et de l'EC chez les vaches laitières en postpartum. Dans un essai contrôlé randomisé, 60 vaches laitières en postpartum ont été enrôlées et réparties dans deux groupes (saline, n = 29 ; bG-CSF, n = 31) où chaque vache a reçu deux injections de traitement en sous-cutané aux 14^e et 21^e jours en lait (JEL) au creux de la croupe. L'EVP et l'EC ont été diagnostiqués chez les vaches ayant des scores de pus ≥ 3 , d'estérase leucocytaire ≥ 1 ou de neutrophiles $\geq 6\%$. Toutes les réponses immunitaires utérines et les prévalences de l'endométrite étaient plus importantes numériquement dans le groupe bG-CSF, mais ne différaient pas statistiquement de celles du groupe saline. Les résultats étaient aussi non-différents statistiquement pour les performances subséquentes en reproduction et survie dans le troupeau. En conclusion, le traitement au bG-CSF ne semble pas efficace pour prévenir l'EVP et l'EC. Cependant, pour des raisons d'absence de différence significative constaté dans nos résultats, nous recommandons la poursuite de l'étude avec au moins une puissance statistique de 80% et un niveau de confiance de 95% afin de mieux conclure sur l'efficacité de bG-CSF contre l'endométrite.

Mots clés : écoulement vaginal purulent, endométrite cytologique, immunité innée, pegbovigrastim, gestation, vaches laitières

Abstract

The incidences of purulent vaginal discharge (PVD) and cytological endometritis (CE) are high in dairy farms because of uterine contamination associated with peripartum immunosuppression. Pegbovigrastim (bG-CSF) has been approved for the prevention of clinical mastitis in postpartum dairy cows. The objective of this study was to evaluate the efficacy of bG-CSF in the prevention of PVD and CE in postpartum dairy cows on the 35th day postpartum. In a randomized controlled trial, 60 postpartum dairy cows were enrolled and divided into two groups (saline, n = 29; bG-CSF, n = 31) where each cow had received two injections subcutaneously on the 14th and 21st days postpartum at the base of the tail. PVD and CE were diagnosed in cows at with scores of pus ≥ 3 and leukocyte esterase ≥ 1 or neutrophils $\geq 6\%$, respectively. bG-CSF group but did not differ statistically from those of the saline group ($p > 0.05$). Differences were also not significant for subsequent performance of cows in reproduction parameters and survival in the herd. In conclusion, bG-CSF treatment did not seem effective in preventing PVD and CE in dairy cows. However, for reasons of absence of significant difference observed in our results, we recommend the continuation of the study with at least a statistical power of 80% and a level of confidence of 95% in order to better conclude on the effectiveness of bG-CSF against endometritis.

Key words: purulent vaginal discharge, cytological endometritis, innate immunity, pegbovigrastim, pregnancy, dairy cow

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures	8
Liste des abréviations.....	9
Remerciements.....	10
Introduction.....	3
Chapitre 1 – Revue de littérature.....	13
Section 1 - Période postpartum chez les vaches laitières	14
1.1.1 Éléments physiologiques de l’utérus postpartum	15
1.1.3 Défense utérine contre les pathogènes microbiens et inflammation	20
Section 2 - Étude de l’endométrite chez les vaches laitières en postpartum.....	22
1.2.1 Concept endométrite : évolution et définitions.....	22
1.2.2 Causes et pathogenèse de l’endométrite	23
1.1.3 Contaminants microbiens de l’utérus	24
1.2.4 Prévalence de l’écoulement vaginal purulent et endométrite cytologique	27
1.2.5 Facteurs de risque de l’endométrite.....	28
1.2.6 Diagnostic de l’écoulement vaginal purulent et endométrite cytologique	29
1.2.7 Gestion de l’écoulement vaginal purulent et l’endométrite cytologique.....	35
1.2.8 Impacts de l’écoulement vaginal purulent et l’endométrite cytologique	37
Section 3 - Description du pegbovigrastim.....	38
1.3.1 Définition du pegbovigrastim et notion de pégylation	38
1.3.2 Description des caractéristiques	40
Section 4-Objectifs et hypothèses de recherche	43
Chapitre 2 - Méthodologie de recherche	45
2.1 Conception de l’étude.....	46

2.2 Définition des critères de jugement des résultats	46
2.3 Choix du placebo ou traitement de référence	47
2.4 Sélection de la ferme enrôlée.....	47
2.5 Enrôlement et examen physique des vaches.....	47
2.6 Traitement et observations des vaches	48
2.7 Collecte et examens des échantillons de mucus du tractus génital.....	49
2.8 Suivi et collecte de données de reproduction et d'incidences	51
2.9 Gestion, validation et analyse statiques des données	52
Chapitre 3 – Présentation des résultats de recherche	54
3.1 Description des échantillons de vaches à l'étude	55
3.2 Effet du pegbovigrastim sur l'endométrite	56
3.3 Effet du pegbovigrastim sur les performances de reproduction	60
3.4 Incidences enregistrées après traitement au cours des 120 premiers JEL	67
Chapitre 4 - Discussion générale	71
Chapitre 5 – Conclusion générale	77
Références bibliographiques.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1 - Seuils pour le diagnostic de l'endométrite cytologique et les prévalences chez les vaches laitières par référence bibliographique (Wagener et al., 2017)	35
Tableau 2- Distribution des caractéristiques réelles des groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins entre 28 ^e et 35 ^e JEL dans un essai clinique randomisé	55
Tableau 3- Distribution des réponses immunitaires utérines des groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins entre 28 ^e et 35 ^e JEL dans un essai clinique randomisé.....	56
Tableau 4- Jours en lait (JEL) entre vêlage-première insémination des groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers jours en lactation dans un essai clinique randomisé	60
Tableau 5- Distribution du temps entre vêlage et élimination par traitement (saline et bG-CSF) des vaches laitières Holsteins en postpartum dans un essai clinique randomisé.....	67

Liste des figures

Figure 1- Dispositif de metricheck utilisé pour diagnostiquer l'EVP chez les vaches laitières en postpartum.....	31
Figure 2- Schéma du protocole expérimental de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins en postpartum lors de l'étude clinique.....	49
Figure 3- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur la prévalence de l'EVP chez des vaches laitières Holsteins entre 28 ^e et 35 ^e JEL dans un essai clinique randomisé	57
Figure 4- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur la prévalence de l'EC à PMN chez des vaches laitières Holsteins entre 28 ^e et 35 ^e JEL dans un essai clinique randomisé.....	58
Figure 5- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur la prévalence de l'EC à l'EL chez des vaches laitières Holsteins entre 28 ^e et 35 ^e JEL dans un essai clinique randomisé.....	59
Figure 6- Effet de traitement (salie et bG-CSF) sur la proportion de vaches laitières Holsteins ayant reçues une insémination au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé	61
Figure 7- Courbe de survie de Kaplan-Meier de JEL à l'insémination des deux groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé.....	62
Figure 8- Courbes de survie de Kaplan-Meier de JEL à l'insémination par traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé.....	63
Figure 9- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur le succès à la première insémination chez des vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé.....	64
Figure 10- Courbe de survie de Kaplan-Meier de JEL à la gestation des deux groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé.....	65
Figure 11- Courbes de survie de Kaplan-Meier de JEL à la gestation par traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé.....	66
Figure 12- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur l'élimination des vaches laitières Holsteins au cours des 120 JEL dans un essai clinique randomisé.....	68
Figure 13- Courbe de survie de Kaplan-Meier de JEL à l'élimination dans les deux groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé	69
Figure 14- Courbes cumulatives d'élimination des vaches laitières Holsteins par traitement (saline et bG-CSF) au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé	70

Liste des abréviations

<i>B. spp.</i>	<i>Bacteroides spp.</i>
bG-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes bovins
<i>BoHV-4</i>	<i>Virus de l'herpès bovin de type 4</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endométrite cytologique
EL	Estérase leucocytaire
EV	Écoulement vaginal
EVP	Écoulement vaginal purulent
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
IC95%	Intervalle de confiance de 95%
ITE	Intervalle vêlage-élimination
IVPI	Intervalle vêlage-première insémination
JEL	Jour en lait
MU	Maladie utérine
NaCl	Chlorure de sodium
P	Probabilité
<i>P. melaninogenicus</i>	<i>Prevotella melaninogenicus</i>
<i>P. spp.</i>	<i>Prevotella spp.</i>
PEG	Polyéthylène glycol
PI	Première insémination
PMN	Leucocytes polymorphonucléaires
PP	Période postpartum
PPMN	Proportion de leucocytes polymorphonucléaires
RC	Rapport des cotes
ScEL	Score de l'estérase leucocytaire
ScEVP	Score de l'écoulement vaginal purulent
SPI	Succès à la première insémination
<i>T. pyogenes</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>

Remerciements

En dépit de ma responsabilité principale de ce travail, la production de ce mémoire a été cependant une œuvre collective. À cet effet, j'ai l'honneur de remercier :

❖ En premier lieu mes directeurs de recherche : Dr Jocelyn Dubuc, Dr Kalidou Ndiaye et Dre Marjolaine Rousseau, respectivement directeur principal, premier codirecteur et deuxième codirectrice qui ont accepté de m'encadrer dans ce programme de recherche avec toute leur volonté et professionnalisme. Tous mes souhaits de santé et de bonheur pour vous dans vos projets socioprofessionnels respectifs.

❖ Dr Jocelyn Dubuc, particulièrement, qui m'avait proposé ce projet de recherche dans un contexte inoubliable de la vie. Je vous remercie pour tous vos efforts d'assistance technique, matérielle et d'obtention de financement pour ce projet. J'avoue que votre encadrement a inculqué en moi des connaissances et compétences scientifiques de grande valeur. Je resterai reconnaissant de vos conseils précieux et votre disponibilité de suivi inlassable tout au long de mon parcours académique.

❖ La Faculté des études supérieures et le Regroupement de recherche pour un lait de qualité de l'Université de Montréal pour leur contribution financière à travers les bourses reçues qui m'ont permis de me concentrer sur mes études et atteindre mon objectif de formation dans le délai imparti.

❖ Les membres de mon comité-conseil pour leurs conseils d'orientation et leur contribution scientifique dans la réalisation de ce mémoire.

❖ Jean-Philippe Pelletier, technicien du laboratoire, d'abord pour son assistance technique dans la collecte de données de fermes et laboratoire ainsi que sa collaboration très amicale.

❖ Ma femme et nos enfants : Aissatou Talibé Diallo, Abdourahamane Diallo et Mouhamad Houdi Diallo, pour leur soutien moral.

❖ Le personnel de la ferme participante pour son accueil et sa bonne collaboration

Introduction

Au Québec, l'élevage des vaches laitières est une activité populaire et la capacité des vaches à vêler chaque année a été définie comme la pierre angulaire de la réussite des exploitants. Idéalement, le taux de gestation optimal des vaches laitières a été estimé à 35% dans les troupeaux. Le succès à la première insémination doit être optimal (Ferguson, 1996). Malgré la sélection génétique intensive des vaches laitières pour obtenir un maximum de rendement en veaux et en lait, l'optimisation de la reproduction constitue encore une embûche majeure à la rentabilité des exploitations laitières.

Pratiquement, les problèmes en reproduction des vaches laitières ont été largement associés aux pathologies infectieuses du tractus génital. L'écoulement vaginal purulent (EVP) et l'endométrite cytologique (EC) surviennent secondairement à l'exposition accrue de l'appareil reproducteur aux pathogènes microbiens en période péripartum. Une fois introduit, ces agents pathogènes s'y développent et colonisent intégralement l'utérus par suite de la fragilité du système immunitaire inné local associée aux modifications physiques et physiologiques du tractus reproducteur (Sheldon et al., 2008, Sheldon et al., 2019). Avec une réduction estimée de 25 à 45% des fonctions des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) qui surviennent en période péripartum le taux de contaminations du tractus génital des vaches laitières avoisine 100% (Goff, 2008a, b, Sheldon and Owens, 2017). Les prévalences moyennes de l'EVP et de l'EC entre 30^e et 60^e jours en lait (JEL) ont été estimées respectivement de 20 à 30% et de 37 à 75% dans les troupeaux laitiers (Ribeiro et al., 2013, Pascottini et al., 2016, Wagener et al., 2017). Les conséquences de l'EVP et de l'EC dans les troupeaux laitiers ont été associées à la réduction de l'expression de l'œstrus, au prolongement du nombre de JEL ouverts médians et à la réduction du taux conception à la première saillie (Fourichon et al., 2000, Gilbert et al., 2005, McDougall et al., 2007). De plus, l'augmentation des mortalités embryonnaires ou fœtales a été associée aux conséquences de l'EVP et de l'EC (Fair, 2015). D'autres études ont associé l'EVP et de l'EC à l'augmentation du taux de réforme des vaches allant jusqu'à 3,0% et à l'augmentation des coûts de traitement allant jusqu'à 106 \$US par vache dans les troupeaux laitiers (Bartlett et al., 1986, Esslemont and Peeler, 1993, Sheldon et al., 2009b).

Actuellement, plusieurs approches pour gérer les effets négatifs de l'EVP et de l'EC sur les performances en reproduction chez les vaches laitières ont été investiguées, mais elles sont surtout limitées principalement à l'utilisation d'antibiotiques (Sheldon et al., 2009b). Récemment, à l'aide de 2 études consécutives randomisées de la céphapirine, une nouvelle génération d'antibiotique s'était limitée à une simple réduction de l'EVP et de l'EC au 35^e JEL. D'ailleurs, l'approche prostaglandine n'avait produit aucun effet positif sur les performances de reproduction ultérieures des vaches soumises (Dubuc et al., 2011). Dans cette incertitude et les risques de résistance des agents pathogènes communs à l'homme aux antibiotiques, de nouvelles initiatives de prévention des maladies sans utiliser les antibiotiques s'avèrent nécessaires afin de parvenir à satisfaire l'objectif de réduction de leur utilisation sur les fermes.

Le pegbovigrastim (bG-CSF) est une molécule synthétique du facteur naturel de stimulant des colonies de granulocytes bovins. Le bG-CSF a été approuvé au Canada et dans d'autres pays pour diminuer le risque de la mammite clinique favorisée par l'immunosuppression durant les 30 premiers JEL chez les vaches et taures laitières en péripartum. Son administration est recommandée 1 semaine avant le vêlage ainsi que 24 heures après. Actuellement, l'efficacité du bG-CSF contre la mammite clinique dans les troupeaux est estimée entre 25% et 35% (Canning et al., 2017, Van Schyndel et al., 2018). Pratiquement ce sont les PMN produits qui assurent la protection immunitaire (Canning et al., 2017, McDougall et al., 2017, Schyndel et al., 2018). À présent, le bG-CSF a été homologué seulement contre la mammite clinique.

C'est en se basant sur ces constats et dans le but d'explorer davantage les bienfaits du pegbovigrastim pour améliorer la gestion sanitaire de la reproduction des troupeaux laitiers que nous avons entrepris cette étude portant sur l'efficacité d'un traitement de pegbovigrastim pour prévenir l'EVP et l'EC chez les vaches laitières en période postpartum (PP).

Pour sa réalisation, nous allons tout d'abord effectuer une synthèse critique de la littérature. Ensuite, nous allons présenter un essai expérimental randomisé dans une exploitation laitière suivi de la présentation et de l'analyse des résultats. Enfin, nous allons discuter les résultats obtenus et tirer une conclusion.

Chapitre 1 – Revue de littérature

Compte tenu de la diversité des études sur la gestion de la reproduction des vaches laitières et la santé utérine, cette revue s'intéresse particulièrement aux aspects relatifs à mon objectif de recherche. D'abord, elle aborde la période postpartum dans ses défis immunitaires et de contamination du tractus génital des vaches laitières. Ensuite, elle étudie la reproduction et l'endométrite dans sa généralité chez les vaches laitières et enfin présente le pegbovigrastim. Je tiens à préciser que cette revue se veut plus critique que systématique afin de toucher les perspectives de recherche réellement en suspens sur l'endométrite dans toute sa composante et les effets probables du pegbovigrastim.

Section 1 - Période postpartum chez les vaches laitières

Chez les vaches laitières, la période postpartum (PP) fait l'objet d'une préoccupation majeure (LeBlanc, 2008). La PP chez les vaches laitières a été définie comme étant l'intervalle de temps d'environ quarante jours s'écoulant entre le début du vêlage et le retour à un état normal de l'utérus suite à son involution (Sheldon, 2004). Cette définition est largement acceptée (Sheldon et al., 2009b). Pratiquement, cette définition laisse croire qu'au stade postpartum, l'état de l'utérus des vaches n'est pas normal en raison de l'influence de divers facteurs qui pourraient être néfastes pour la reproduction subséquente et la survie de l'animal dans le troupeau. Un autre auteur a défini autrement la PP comme l'intervalle de temps entre le vêlage et le premier œstrus accompagné d'ovulation (Kiracofe, 1980).

Présentement, plusieurs chercheurs travaillant pour améliorer la gestion des troupeaux laitiers s'accordent pour dire que le succès actuel de la reproduction des vaches laitières dépend largement d'une gestion efficace de la PP (Sheldon et al., 2009a, Sheldon et al., 2009b, Sheldon and Owens, 2017). La PP est influencée par une réduction de consommation alimentaire, une immunosuppression périparturiente, une contamination microbienne fréquente dans l'utérus et une persistance possible des agents pathogènes dans l'utérus. Des pertes économiques substantielles peuvent être encourues durant cette période importante due notamment aux traitements, à la baisse de reproduction, et à la hausse de mortalité ou réforme (LeBlanc, 2008, Sheldon et al., 2009a).

D'autres auteurs ont démontré l'importance de la suppression immunitaire chez les vaches laitières en postpartum avec une réduction considérable de la capacité immunitaire

des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) pouvant aller de 25 à 45% (Donofrio et al., 2007, Goff, 2008a). L'immunosuppression chez les vaches laitières en postpartum empêche l'élimination des pathogènes, des lochies et augmente l'inflammation de l'endomètre (Gilbert et al., 2007).

Autour d'une contamination microbienne associée à l'EVP et à l'EC, plusieurs indicateurs de troubles physiologiques de la reproduction ont été rapportés tels qu'un retard d'involution utérine avec infertilité subséquente (Sheldon, 2004, Sheldon and Dobson, 2004). Aussi, l'inactivité ovarienne, l'absence d'œstrus, la réduction des concentrations plasmatiques de progestérone et d'estradiol ont été rapportées chez les vaches atteintes de l'EVP et de l'EC (Wetteman, 1980). En plus, un milieu utérin sous-optimal pour la conception et la gestation est parfois développé chez les vaches positives de l'EVP et de l'EC (Kiracofe, 1980). Des échecs de fécondation, puis des mortalités embryonnaires ou fœtales sont également notés (Fair, 2015).

1.1.1 Éléments physiologiques de l'utérus postpartum

La PP chez les vaches laitières est marquée par diverses modifications anatomiques et physiologiques. Par conséquent, le retour à une santé utérine normale demeure nécessaire et indispensable pour une réussite efficace de la reproduction subséquente. Bref, chez les vaches laitières en postpartum, l'involution utérine, le retour de l'activité cyclique ovarienne et la restauration des fonctions immunitaires de l'endomètre ont été identifiés comme événements biologiques de la reproduction les plus importants à accomplir afin de permettre le retour normal de l'utérus après le vêlage (Sheldon, 2004, Sheldon et al., 2011a, b).

1.1.1.1 Involution utérine

Il s'agit du processus de retour à l'état réceptif normal de l'utérus pendant les 45 premiers JEL et demeure le premier événement biologique de la reproduction qui se produit chez les vaches laitières après le vêlage (Sheldon, 2004, Sheldon et al., 2011b). Après le vêlage, le poids de l'utérus des vaches a été estimé jusqu'à environ 9 kilogrammes dont 1 à 2 litres de lochies (Kiracofe, 1980, Sheldon, 2004, Sheldon et al., 2011b). Cependant, le

volume utérin régresse de manière progressive pendant la PP jusqu'à peser environ 1 kilogramme au 30^e JEL (Kiracofe, 1980, Short et al., 1990).

Par ailleurs, d'autres auteurs ont rapporté l'association entre l'involution utérine et le retour physiologique de l'utérus et ont noté que la régression du poids de l'utérus se complète pendant les 2 premières semaines suivant le vêlage lorsque les conditions physiologiques sont normales (Short et al., 1990, Sheldon et al., 2009a). Cependant, lorsque le processus d'involution utérine est associé à une infection microbienne ou à de l'inflammation sévère, la régression utérine peut devenir incomplète (Short et al., 1990). Une évaluation du diamètre des cornes utérines de 75 vaches laitières Holsteins et frisonnes durant la PP a enregistré une régression du volume utérin pendant les 40 premiers JEL (Sheldon, 2004).

1.1.1.2 Retour de l'activité ovarienne

Après l'involution utérine, le retour de l'activité ovarienne a été identifié comme une seconde étape nécessaire et indispensable pour la réussite de la reproduction future chez les vaches laitières en postpartum (Sheldon et al., 2011b). Plusieurs observations ont fait état des modifications de l'activité ovarienne par les réponses immunitaires, l'EVP et l'EC chez les vaches laitières en postpartum. Sous l'influence des réponses immunitaires, de l'EVP et de l'EC, près de 50% des vaches laitières en PP ne parviennent pas à ovuler le premier follicule dominant après le vêlage entre 14^e et 28^e JEL (Mateus et al., 2002, Williams et al., 2005, Sheldon et al., 2011a). Cette remarque avait été rapportée où de nombreux cycles œstraux anormaux comprenaient une période anovulatoire des phases lutéales prolongées (Morrow, 1966, Leslie, 1983, Stevenson and Call, 1988). Les vaches laitières en PP, diagnostiquées avec un EVP au 42^e JEL étaient moins susceptibles d'avoir ovulé entre 60^e et 70^e JEL que les vaches en bonne santé (Burke et al., 2010). Ailleurs, une réduction d'au moins 50% de la fréquence des œstrus, de la durée des œstrus et du taux de conception à la première saillie chez les vaches atteintes de l'EVP a été notée (Donofrio et al., 2007). Aussi, par comparaison du nombre de follicules ovariens entre les vaches en bonne santé et celles affectées, une réduction du nombre de follicules a été notée chez les vaches atteintes de l'EVP (Maquivar et al., 2015). Également, un risque plus grand de

kystes ovariens chez les vaches laitières en PP diagnostiquées de l'EVP entre 14^e et 42^e JEL a été constaté (Tsousis et al., 2009).

Comme pour l'EVP, l'association entre l'EC et l'activité ovarienne a aussi été évaluée. Chez les vaches positives de l'EC au 25^e JEL un retard moyen de reprise de l'activité ovarienne de 18,7+/-1,4 jours a été rapporté par rapport aux vaches normales qui avaient un retard moyen de 13,2+/-0,9 jours (Salehi et al., 2017). D'autres investigations ont rapporté aussi que les vaches avec l'EC avaient une reprise tardive de l'activité ovarienne après le vêlage et des effets hormonaux (Sheldon et al., 2009a, Dubuc et al., 2010d, Dubuc et al., 2012).

En dépit de toutes ces preuves existantes, l'association entre la cyclicité postpartum, la santé utérine et la fertilité des vaches est discutée. Des résultats différents en ce qui concerne le lien entre l'EVP et l'EC et la cyclicité ovarienne ont été notés. L'incidence de l'EC chez les vaches ayant débuté le cycle au 29^e JEL était inférieure par rapport à celle chez les vaches ayant débuté leur cycle ovarien plus tard, soit au 49^e JEL (Galvão et al., 2010). En revanche, dans certaines expériences, aucune relation entre l'EC, la cyclicité ovarienne, la parité et le JEL au moment du diagnostic n'a été révélée (Carneiro et al., 2014). Par contre en se basant sur les cytokines pro-inflammatoires du tractus reproducteur, les vaches ayant repris leur cyclicité ovarienne plus tôt après le vêlage ont démontré une expression plus grande de signaux inflammatoires de l'ARNm de cytokines entre le 40^e et 60^e JEL par rapport aux vaches qui ont débuté leur cycle plus tard (Heppelmann et al., 2015). Des effets à long terme de l'EC sur la fonction ovarienne chez les vaches laitières en postpartum, survenus à la suite de la perturbation hormonale avec réduction des concentrations d'estradiol, de déhydroépiandrostérone, d'androstènedione et de testostérone avec des concentrations importantes de cortisol dans les follicules libérés ont été rapportés (Green et al., 2011).

1.1.1.3 Régénération de l'endomètre

La régénération de l'endomètre représente la dernière étape du processus physiologique de l'utérus des vaches laitières en postpartum. La régénération de l'endomètre est une activité essentielle au succès futur de la reproduction en général chez

les mammifères en postpartum (Sheldon, 2004, Sheldon et al., 2011b, Velladurai et al., 2016). Des études chez les humains ont qualifié l'endomètre comme l'unique tissu qui subit une excrétion cyclique physiologique et une régénération ultérieure sans cicatrices à des intervalles d'environ 1 mois tout au long des temps de procréations (Aghajanova et al., 2018). Pratiquement, le processus de régénération de l'endomètre est naturel et est assuré par des mécanismes cellulaires et hormonaux (Gargett et al., 2008, Gargett and Masuda, 2010). De nombreuses variétés de molécules organiques sécrétées par les glandes endométriales, les fibroblastes, les plaquettes, les cellules souches / progénitrices épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les cellules endothéliales chez les mammifères sont impliquées dans la régénération de l'endomètre (Gargett and Masuda, 2010, Kaitu'u-Lino et al., 2012, Velladurai et al., 2016). Par exemple, après le vêlage, les plaquettes interviennent immédiatement dans la réparation du tissu utérin en empêchant le saignement. Les plaquettes contiennent des granules contenant des facteurs de croissance et des cytokines libérés lors de leur activation des plaquettes au site de la lésion ou de l'inflammation. Ces facteurs sont essentiels pour activer les fibroblastes et recruter les leucocytes au site de la lésion, ainsi que pour induire et régler la prolifération et la migration d'autres types de cellules impliquées dans la réparation tissulaire, telles que les cellules musculaires lisses, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules endothéliales pour l'angiogenèse (Langer et al., 2009, Stellos et al., 2010). Quant à l'effet des hormones sexuelles dans la régénération de l'endomètre, des études ont rapporté que l'œstrogène induit la prolifération des cellules épithéliales et stromales de l'endomètre en régulant à la hausse la synthèse et la sécrétion du facteur de croissance. L'œstrogène augmente l'expression de récepteurs cellulaires qui assurent la reconnaissance de non-soi. En ce qui concerne la progestérone, elle intervient dans la phase de sécrétion de l'endomètre où elle inhibe la prolifération et provoque la différenciation des cellules épithéliales et la décidualisation des cellules stromales (Stellos et al., 2010).

Quant à la qualité du processus de régénération de l'endomètre, elle varie selon le temps postpartum. Chez les vaches en postpartum, des études ont rapporté des niveaux de régénération de l'endomètre variant de partielle en 28 JEL à complète en 45 JEL (Sheldon, 2004, Sheldon et al., 2011b). La perte de l'allantochorion suivie de la nécrose des

caroncules utérines qui disparaissent en 12 jours est un processus de régénération de l'endomètre qui se complète superficiellement au 25^e JEL, et profondément au bout de 6^e et 7^e semaines ou 35^e JEL.

À cet effet, certaines études ont rapporté l'intérêt de l'utilisation des produits biologiques comme les perfusions intra-utérines de plasma riche en plaquettes pour stimuler le processus de régénération de l'endomètre après l'accouchement ou les menstruations anormales chez la femme (Gargett et al., 2001, Gargett and Masuda, 2010, Aghajanova et al., 2018). Cependant, à la limite de nos connaissances actuelles l'utilisation de ces traitements en médecine vétérinaire demeure non courante.

1.1.1.4 Décontamination de l'utérus

Une importance cruciale de la décontamination de l'utérus a été également notée dans la réussite de la reproduction future des vaches en PP (Sheldon et al., 2011b). La contamination utérine peut atteindre environ 100% des vaches après le vêlage (Sheldon and Dobson, 2004, Williams et al., 2008, Sheldon and Owens, 2017) . La contamination élevée de l'utérus est particulièrement due à la suppression des fonctions immunitaires innées locales associée au relâchement des barrières physiques génitales favorisant la pénétration des agents pathogènes (Kehrli Jr et al., 1991, Goff, 2008a). L'adhésion, la multiplication, l'invasion des tissus utérins par les différents microbes infiltrés et leur résistance pendant la PP retardent ainsi le retour normal de la physiologie de l'utérus pour la reproduction future. À cet effet, il a été noté que l'expulsion de ces microbes demeure une condition importante pour finaliser l'involution complète de l'utérus chez les vaches en postpartum (Sheldon et al., 2011a). Le mécanisme exact semble encore incompris, mais il a toutefois été attribué à l'activité de l'immunité innée de l'utérus à travers son endomètre qui assure une défense solide contre les infections véhiculées (Herath et al., 2009, Sheldon et al., 2011b). Ce constat a été partagé par d'autres chercheurs qui supposent qu'une certaine réponse inflammatoire de l'endomètre postpartum est essentielle à la clairance bactérienne et au rétablissement de la fonction endométriale (Gabler, 2010, Chapwanya et al., 2012). Certains pathogènes comme *Escherichia coli* (*E. coli*), *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), etc. couramment rencontrés dans l'utérus des vaches en

postpartum sont rarement détectés chez les vaches atteintes de l'EC avec le fonctionnement de l'immunité innée de l'utérus (Sheldon et al., 2006, Melcher et al., 2014).

Il a été constaté que la réponse immunitaire innée aux infections bactériennes dépend de la capacité de l'utérus à élaborer des protéines pro-inflammatoires qui sont des puissants stimulants des protéines de la phase aigüe telles que les cytokines ou peptides antimicrobiens, les prostaglandines la glycoprotéine à l'acide (Gayle et al., 1999, Fischer et al., 2010, Lind et al., 2015). Ces médiateurs du processus inflammatoire inné sont régulés positivement sur le plan physiologique au cours de la période puerpérale et mobilisent et activent les cellules inflammatoires PMN dans l'utérus contre les agents pathogènes microbiens. L'expression la plus élevée de cytokines a été observée chez les animaux en bonne santé au cours de la 3^e semaine postpartum (Gabler et al., 2009, Chapwanya et al., 2012).

1.1.3 Défense utérine contre les pathogènes microbiens et inflammation

Un lien étroit entre le développement des MU causées par les pathogènes microbiens et la défense immunitaire de l'utérus des vaches postpartum a été établi (LeBlanc et al., 2011, Chapwanya et al., 2012, Ghanem et al., 2014). Des investigations ont montré que le développement d'une infection et d'une inflammation ou d'un retour à la normale de l'utérus postpartum chez les vaches laitières dépend grandement du fonctionnement du système immunitaire en PP (LeBlanc et al., 2011).

L'immunité innée et l'immunité adaptative ont été associées à cette protection de l'utérus contre les agents pathogènes microbiens (Brackenbury et al., 2003, Medzhitov, 2007). L'immunité innée ou réponse non spécifique de l'utérus est vue comme un ensemble de mécanismes de défense naturelle de première ligne face à une infection. Lorsque cette défense est activée à la suite de facteur comme le vaccin, elle s'adapte de manière spécifique à la source immunologique. Des études ont montré que l'immunité innée et l'immunité adaptative peuvent agir synergiquement même si l'ampleur et la qualité de la réponse adaptative dépendent des signaux dérivés de la réponse innée stimulée (Brackenbury et al., 2003). En plus de son caractère spécifique, la réponse immunitaire adaptative de l'utérus contre les pathogènes et l'inflammation utérine est assurée par un

nombre restreint de cellules notamment les lymphocytes T et B (Brackenbury et al., 2003). Quant à l'immunité innée, des études ont démontré qu'elle est assurée par un ensemble plus important de cellules sanguines et tissulaires avec prédominance des PMN. Le caractère non spécifique des PMN leur permet d'assurer la défense de l'utérus contre les pathogènes microbiens et la régulation immédiate de l'inflammation postpartum (Grasso, 2002, Turner et al., 2012). Au niveau de l'utérus, les PMN représentent une des composantes très importantes de l'immunité locale (Burg and Pillinger, 2001, Hammon et al., 2006, Turner et al., 2012). En période péripartum, l'immunité innée peut être enclenchée plusieurs semaines avant l'apparition de la maladie puisque les vaches subissent une immunosuppression péripartum transitoire avec altération des fonctions de phagocytose et de l'activité oxydative des neutrophiles (Kimura et al., 1999, Hammon et al., 2006). De plus, la production accrue de cortisol endogène lors du vêlage affecte négativement l'expression de la protéine responsable de l'adhésion des PMN durant leur roulement sur la surface de l'endothélium (Burg and Pillinger, 2001).

Les mécanismes d'action des PMN en période péripartum chez les vaches laitières ont été largement étudiés et rapportés. Normalement, après le vêlage, les PMN sont recrutés à partir de la moelle osseuse des vaches pour augmenter leur nombre au site de l'inflammation, soit de l'utérus (Turner et al., 2012). Avec une réponse immunitaire efficace, les PMN réduisent la sensibilité des vaches en PP aux infections bactériennes et favorisent la régulation de l'inflammation de l'utérus et l'amélioration de performances reproductives. Il a été prouvé par de nombreuses études qu'un afflux rapide et substantiel des PMN dans l'utérus après le vêlage assure une réponse inflammatoire associée à une incidence réduite des troubles utérins chez les vaches en PP (Galvão et al., 2011, Turner et al., 2012, Gilbert and Santos, 2016). Les PMN engloutissent les pathogènes et les détritrus utérins (Sheldon et al., 2014). Des fonctions principales des PMN sont l'activation, l'adhésion et la migration endothéliales, la reconnaissance et la neutralisation des agents pathogènes à l'aide des fonctions de phagocytose et l'activité oxydative intracellulaire, la dégranulation extracellulaire, les pièges extracellulaires, l'apoptose et la résolution de l'inflammation (Turner et al., 2012, Liew and Kubes, 2019).

Section 2 - Étude de l'endométrite chez les vaches laitières en postpartum

1.2.1 Concept endométrite : évolution et définitions

La caractérisation du concept endométrite a longtemps variée dans la littérature scientifique selon les études, les moments d'investigation ou les procédures de mise en œuvre des observations. Malheureusement, il a fallu attendre jusqu'en 2006 pour obtenir des définitions bien acceptées des concepts cliniques et subcliniques de l'endométrite permettant de faciliter le diagnostic et la gestion de l'endométrite dans les troupeaux laitiers (Gilbert et al., 2005, Sheldon et al., 2006). Il existe maintenant de nombreuses preuves scientifiques que l'endométrite postpartum évolue chez les vaches laitières de manière aussi bien clinique que subclinique (Dubuc et al., 2011, Denis-Robichaud and Dubuc, 2014, Sheldon and Owens, 2017).

Plus récemment, puisque l'insuffisance de compréhension des concepts de l'endométrite persistait encore au sein de la communauté scientifique même après de nombreuses contributions, des nouvelles définitions plus explicites ont été élaborées (Sheldon, 2006, LeBlanc, 2008, Dubuc et al., 2010a). La combinant les données cliniques et cytologiques de l'endométrite ont permis de classer les vaches affectées en deux états de santé : l'écoulement vaginal purulent (EVP) ou de l'endométrite cytologique (EC). Mais certaines vaches peuvent avoir les 2 maladies de façon concomitante. Récemment, Le concept de l'endométrite a été spécifié durant la dernière décennie en EVP en remplacement de l'endométrite clinique et en EC (Dubuc et al., 2010a, Gilbert, 2016b). Ainsi, conformément aux suggestions précédentes, pour la suite de ce travail, ce sont les termes EVP et EC qui seront utilisés.

1.2.1.1 Écoulement vaginal purulent

La définition de l'EVP a évolué dans la littérature scientifique. Cette évolution fait suite après la première définition de l'EVP incluant son effet négatif sur les performances de la reproduction (LeBlanc et al., 2002). Récemment, en se basant sur une échelle de 0 (écoulement clair) à 3 (écoulement fétide aqueux, purulent ou brun) l'EVP a été caractérisé par la présence même de mucus d'un score supérieur ou égal à 1, diagnostiqué au 21^e JEL ou plus associé à une baisse de performance de reproduction (Giuliodori et al., 2017). Cette précision de cas d'endométrite clinique par EVP détecté dans le vagin des vaches en PP

permet dorénavant premièrement de pallier l'insuffisance de la méthode clinique de diagnostic de cette forme d'endométrite. Aussi, d'autres auteurs pensent que définir l'EVP en association avec la performance reproductive des vaches atteintes permet de répondre à la nuance soulevée avec objectivité que toute inflammation n'était liée à l'EVP et que ces conditions pouvaient avoir des facteurs de risque différents (Dubuc et al., 2010a). Un autre avantage fondamental de cette définition pourrait être ce caractère plus descriptif de l'EVP qui désormais doit être employé en remplacement du terme « endométrite clinique » contrairement à l'EC (Dubuc et al., 2010a).

1.2.1.2 Endométrite cytologique

L'endométrite cytologique (EC) est encore appelée endométrite subclinique (Wagener et al., 2017). L'EC a été consensuellement défini comme une inflammation de l'endomètre caractérisée par une présence accrue de neutrophiles dans les échantillons cytologiques de l'endomètre prélevés par la technique de cytobrosse (Dubuc et al., 2010a, Wagener et al., 2017). Le pourcentage des PMN déterminant cette inflammation varie selon les études et les objectifs de recherche. Par exemple, une fourchette de proportion de 5,5 à 10% indiquant l'état inflammatoire de l'utérus a été rapportée par (Sheldon et al., 2009b). Une proportion de 6% des PMN dans le mucus utérin chez les vaches Holsteins au 35^e JEL avait permis d'élaborer une définition optimale de la reproduction, mais avec des sensibilités très faibles pour la prédiction future de l'EC (Dubuc et al., 2010a). Par ailleurs, un seuil de 18% des PMN avait été utilisé pour définir l'EC, mais chez une population de vaches Holsteins en postpartum ne présentant aucun signe clinique (Kasimanickam et al., 2004).

Ces différends entre les études justifient l'idée que l'EC est une nouvelle terminologie utilisée pour caractériser la présence d'inflammation endométriale dont l'exploration devrait encore se poursuivre chez les vaches laitières en PP (Wagener et al., 2017).

1.2.2 Causes et pathogenèse de l'endométrite

Bien que des revues de littératures ont fait état de certaines incompréhensions dans le mécanisme causal de l'endométrite, divers facteurs responsables de pathogenèse de

l'EVP et l'EC chez les vaches en postpartum ont été incriminés (Sheldon et al., 2008, Wagener et al., 2017). Principalement, ces facteurs sont d'ordre alimentaire caractérisé par la suppression immunitaire péripartum, associée à la présence des pathogènes microbiens ayant envahi l'utérus (Hammon et al., 2006, Goff, 2008b, Goff, 2013). Il a été rapporté qu'après le vêlage, l'utérus des vaches est souvent envahi par la voie ascendante par des micro-organismes pathogènes qui entraîneraient une infection locale (Boer et al., 2014, Wagener et al., 2017, Roche et al., 2018). L'infection de l'utérus par ces agents pathogènes implique leur adhérence à la muqueuse, la colonisation ou la pénétration de l'épithélium utérin, et la libération des toxines conduisant à l'établissement de l'EVP et de l'EC. Cependant, il a été constaté que le développement de l'EVP et de l'EC dépend à la fois de la réponse immunitaire des vaches, de leur statut reproductif (primipare ou multipare), de l'espèce et du nombre d'agents pathogènes introduits dans l'utérus.

Généralement, la présence des pathogènes cités plus haut dans le tractus reproducteur des vaches laitières en postpartum semble être attribué à l'exposition de leur tractus reproducteur en période péripartum et le rôle des débris tissulaires de l'épithélium de l'utérus après vêlage qui favorise la croissance des pathogènes (LeBlanc et al., 2011). Parmi les bactéries pathogènes précédemment citées, *E. coli* et *A. pyogenes* suivis par les bactéries anaérobiques telles que *F. nectrophorum* et *Prevotella melaninogenicus* (*P. melaninogenicus*) sont les plus incriminées dans les infections utérines (Sheldon et al., 2010, LeBlanc et al., 2011). Particulièrement, il a été rapporté que l'infection de l'utérus par *E. coli* semble exposer ultérieurement le milieu utérin à d'autres bactéries ou virus. Cela serait dû au fait que les potentiels pathogènes appelés *E. coli* spécifique pathogène de l'endomètre facilitent la cohabitation synergique de *A. pyogenes* et les bactéries anaérobiques dans l'utérus (Sheldon et al., 2010).

1.1.3 Contaminants microbiens de l'utérus

La période péripartum est une période critique pour les vaches laitières. à la période péripartum, environ 100% des utérus sont contaminés par des bactéries au cours des 2 premières semaines (Sheldon and Dobson, 2004, Sheldon et al., 2004, Williams et al., 2005). En plus des bactéries, l'association des virus aux infections utérines des vaches

laitières a été aussi rapportée même si l'impact de ces derniers demeure plutôt méconnu (Sheldon et al., 2011b).

1.2.3.1 Contamination virale de l'utérus

Bien que le diagnostic des infections virales demeure encore peu investigué, il existe dorénavant des preuves scientifiques des effets négatifs du virus de l'herpès bovin 4 (BoHV-4) sur l'utérus des vaches (Donofrio et al., 2007, Nikolin et al., 2007). Cependant, le BoHV-4 est encore le seul pathogène viral isolé des infections utérines des vaches laitières. Cette découverte du BoHV-4 a permis de conclure que le virus est bien associé à la métrite chez les vaches avec un tropisme important pour l'endomètre et une réplication rapide suivis d'une destruction des cellules épithéliales et le stroma (Donofrio et al., 2007, Nikolin et al., 2007). Dans l'utérus, le BoHV-4 possède un effet cytopathique et réduit la sécrétion des prostaglandines des cellules épithéliales de l'endomètre, dérégulant de la durée de vie du corps jaune (Donofrio et al., 2007). Toutefois, il a été précisé que l'étude était réalisée simplement sur les cellules stromales et épithéliales dépourvues de cellules leucocytaires immunitaires conférant à l'endomètre son mécanisme de défense (Donofrio et al., 2007).

1.2.3.2 Contamination bactérienne de l'utérus

Après la parturition, la détection des bactéries dans la lumière utérine peut avoir lieu chez toutes les vaches (Jeon et al., 2015). Un large éventail de bactéries a été isolé dans la lumière utérine des vaches laitières en PP (Miller et al., 2007, Bicalho et al., 2012, Pothmann et al., 2015). La source de contamination bactérienne n'est, cependant, pas encore clairement établie même si de nombreuses études ont supposé qu'après le vêlage, les bactéries atteindraient l'utérus à partir du canal génital (Kaneene and Miller, 1995, Benzaquen et al., 2004, Schuenemann et al., 2011).

Les bactéries les plus fréquemment rapportées ont été *Escherichia coli* (*E. coli*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *F. necrophorum*, *Prevotella spp.* (*P. spp.*) et *Bacteroids spp.* (*B. spp.*) (Bicalho et al., 2010, Santos et al., 2011, Jeong et al., 2017). Il a été supposé que ces bactéries atteignent l'utérus à partir de l'environnement de la vache, mais demeure aseptique pendant la gestation. Cependant, avec l'évolution des connaissances et des nouvelles technologies, des découvertes récentes ont remis en

question cette croyance selon laquelle les agents pathogènes utérins atteignent l'utérus à partir de l'environnement, car la présence des bactéries dans l'utérus des génisses vierges et des vaches gestantes a été notée même si cela n'était pas associée à de l'inflammation endométriale (Karstrup et al., 2017, Moore et al., 2017). De plus, durant la gestation, des bactéries pathogènes peuvent migrer par voie hématogène vers l'utérus des vaches et se localiser dans l'endomètre ou les placentomes ou les deux à la fois (Jeon et al., 2017, Karstrup et al., 2017).

Par ailleurs, il est à signaler que même si plusieurs des sources citées plus haut sont d'accord sur l'implication principale d'*E. coli*, de *T. pyogenes*, de *F. necrophorum*, de *Prevotella. spp.* et de *Bacteroides. spp.* dans les processus pathologiques des maladies utérines (MU) des vaches en PP, de nombreuses autres bactéries ont été aussi isolées (Machado et al., 2012, Wagener et al., 2014, Pothmann et al., 2015). Les *Proteus spp.*, les *Streptocoques non hémolytiques* et de *Mannheimia haemolytica (M. haemolytica)* ont été aussi rapporté à la suite de l'examen du mucus vaginal fétide collecté dans la cavité utérine des vaches laitières en PP (Sanz et al., 2004). Une étude a admis que ces espèces bactériennes de l'utérus constituent des facteurs de risques pour l'EVP et l'EC, mais n'ont retrouvé que *E. coli* et *T. pyogenes* respectivement chez trois vaches seulement allouées à leur expérience. D'ailleurs, en évaluant à 95% l'activité ovarienne des vaches incluses dans leur étude, les auteurs avaient conclu que ces bactéries jouent un rôle mineur dans les causes des MU (Pothmann et al., 2015).

Afin de mieux prendre en charge les maladies causées par les bactéries communes de l'utérus, certaines études se sont intéressées au rapport entre les effets pathogéniques des bactéries de l'utérus, la proportion des PMN, et le temps d'évolution de l'EVP et de l'EC (Westermann et al., 2010, LeBlanc et al., 2011). Sur le plan scientifique, ces études ont contribué davantage à la compréhension de la colonisation bactérienne de l'utérus des vaches laitières en postpartum. Une proportion des PMN entre le 21^e et 27^e JEL ont montré une corrélation positive entre la présence d'*E. coli* et l'EC, mais non entre les *Streptocoques non hémolytiques* et l'EC (Westermann et al., 2010). La présence de l'EVP a été également associée aux facteurs de virulence spécifiques à *E. coli* (LeBlanc et al., 2011). Un accord a été trouvé entre la présence d'*E. coli*, *T. pyogenes*, *F. necrophorum*, *P.*

melaninogenica et *Proteus spp.* et le pourcentage des PMN utérins lors de la cytobrosse utérine du 29 au 43^e JEL chez les vaches Holsteins primipares et multipares (McDougall et al., 2007). La proportion des PMN dans le mucus utérin contenant *T. pyogenes* chez les vaches Holsteins en postpartum a été estimée de plus de 0,6% par rapport aux vaches indemnes entre 31^e et 59^e JEL (Madoz et al., 2014).

1.2.4 Prévalence de l'écoulement vaginal purulent et endométrite cytologique

Les prévalences de l'EVP et de l'EC actuelles sont considérables et varient d'une étude à l'autre respectivement de 20% à 30% et de 37% à 75% (Boer et al., 2014, Pascottini et al., 2016, Wagener et al., 2017). Les raisons fondamentales liées à cette variation ont été attribuées principalement à l'insuffisance de description des méthodes de diagnostic utilisées, au choix de leurs seuils d'interprétation, à la classification des infections utérines et à la PP au cours de laquelle l'infection a été déclarée. Aussi, l'influence d'autres facteurs comme les caractéristiques générales des vaches notamment la parité ou l'âge, la race et les pratiques de gestions des troupeaux laitiers ont été répertoriées dans les variations des prévalences de l'EVP et de l'EC chez les vaches en PP (Boer et al., 2014, Sheldon and Owens, 2017, Wagener et al., 2017).

Pratiquement, il a été noté que de tous ces facteurs influençant les prévalences de l'EVP et de l'EC chez les vaches laitières en PP, le temps d'investigation demeure le plus important. Dans toutes les études consultées, il a été constaté que même avec des seuils de diagnostic similaires, les prévalences de l'EVP et de l'EC diffèrent en fonction de la PP d'investigation (Gilbert et al., 2005, Ribeiro et al., 2013, Pothmann et al., 2015). En prenant par exemple l'EC, une prévalence moyenne de 12,7% a été rapportée en utilisant un seuil supérieur ou égal à 5% de PMN dans le mucus utérin collecté par la technique de cytobrosse effectuée à 271 JEL en moyen. Les auteurs avaient conclu qu'il n'est presque pas possible de mener un tel essai avec un report de l'élevage de plus de 200 jours dans une ferme laitière commerciale (Pothmann et al., 2015). Par ailleurs, une autre étude utilisant un seuil supérieur ou égal à 5% de PMN et la même technique de cytobrosse chez les vaches laitières en postpartum inscrites à un programme d'insémination artificielle entre 28^e JEL +/- 3 jours, a rapporté une prévalence de l'EC de 59,0% (Ribeiro et al., 2013). Avec les mêmes procédures, mais évalué entre 40^e et 60^e JEL, une autre étude a

rapporté des prévalences globales moyennes de 37,0% et de 75,0% respectivement de l'EVP et de l'EC dans des troupeaux laitiers (Gilbert et al., 2005).

Aussi, avec le seuil supérieur ou égal à 6% de PMN dans le mucus utérin collecté avec la technique de cytobrosse, le même constat de variation des prévalences de l'EC a été constaté. Une prévalence de l'EC de 29,4% a été rapportée entre 30^e et 43^e JEL (Dubuc and Denis-Robichaud, 2017). Une autre prévalence de 18,7% de l'EC a été rapportée au seuil de 6% de PMN mais au 35^e JEL (Dubuc et al., 2010b).

1.2.5 Facteurs de risque de l'endométrite

Des revues de littératures ont répertorié les facteurs de risque des MU chez les vaches laitières en PP (Sheldon and Dobson, 2004). La mortinatalité, les jumeaux, la dystocie, la rétention placentaire, les conditions métaboliques, la fièvre vitulaire, la cétose, l'équilibre entre la pathogénicité et l'immunité, ainsi que la perturbation des fonctions des neutrophiles ont été cités comme des facteurs de risque les plus importants pour les MU (Potter et al., 2010, Prunner et al., 2014, Giuliadori et al., 2017). L'hygiène environnementale, la race, le type de parcs de vêlage, etc. ont été cités comme facteurs moins importants. De manière spécifique, la dystocie, la rétention placentaire et la métrite sont les plus associés à l'EVP car ils semblent augmenter la plausibilité des traumatismes utérins et la contamination microbienne. Pour l'EC, les facteurs de risques spécifiques rapportés sont la cétose et la perte de poids corporel souvent associées à l'effet de l'immunosuppression ou du déséquilibre métabolique (Dubuc et al., 2010b, Potter et al., 2010).

Récemment, une concentration élevée d'acides gras non estérifiés prépartum supérieure ou égale à 0,6 millimole par litre de sang (mmol/l) et une haptoglobulinémie supérieure ou égale à 0,8 gramme par litre de sang (g/l) ont été rapportées comme facteurs de risque associés à l'EVP et à l'EC au 35^e JEL chez les vaches en PP au Canada (Dubuc et al., 2010d). Une autre étude a rapporté que tous les facteurs de risque étaient associés à l'EC lors de leur investigation dans 38 grandes fermes laitières de l'État de New York (Sheldon and Dobson, 2004). À l'aide d'une analyse statistique multivariée, d'autres chercheurs ont noté le vêlage assisté, la rétention placentaire, la mortinatalité, les jumeaux

et la primiparité comme facteurs de risques associés à la survenue de l'EVP chez les vaches en PP et que la rétention placentaire demeure le risque le plus important (Potter et al., 2010).

En outre, des panels d'experts ont classifié selon leur importance, la rétention placentaire, la dystocie, les jumeaux, la mortinatalité, l'hypocalcémie, le vêlage assisté, le traumatisme vaginal au moment du vêlage, parité et race comme étant les principaux facteurs de risque de l'EVP (Cheong et al., 2011). Selon une autre source, la rétention placentaire et la dystocie sont associées à l'EC et augmentent la réduction de performance de reproduction et le syndrome reproducteur répétitif (Salasel et al., 2010). Une autre étude à l'aide d'un modèle de régression logistique a rapporté l'association entre l'EVP et l'assistance au vêlage et la présence de graisse dorsale d'épaisseur même inférieure ou égale à 15 mm, mais n'a constaté aucun effet relié au parc de vêlage ou la ferme, la saison, la parité et les jumeaux (Prunner et al., 2014). Ailleurs, l'EC était significativement associée à la ferme ou parcs de vêlage même si les vaches en stabulation entravée avaient un risque plus faible de l'EC que les vaches en stabulation avec parcs de vêlage, mais aucun effet de parité entre 35 et 60° JEL (Carneiro et al., 2014).

1.2.6 Diagnostic de l'écoulement vaginal purulent et endométrite cytologique

Afin de mieux comprendre l'EVP et l'EC, plusieurs méthodes ou techniques ont été proposées et sont appliquées actuellement en sciences vétérinaires. La technique du test d'estérase leucocytaire a été rapportée pour le diagnostic de l'EC (Couto et al., 2013). La technique de la cytobrosse a été rapportée pour le diagnostic de l'EC (Kasimanickam et al., 2004, Esposito et al., 2014, Gilbert, 2016a). En plus, une étude a rapporté les tests de diagnostic moléculaire pour la mise en évidence de l'EC (Gilbert, 2016c). Concernant le diagnostic de l'EVP, la technique de metricheck a été largement privilégiée par rapport aux autres techniques possibles (Gilbert et al., 2005, McDougall et al., 2007, McDougall et al., 2013). La technique vaginoscopique a été aussi rapportée pour détecter le pus dans le vagin des vaches en postpartum (Gilbert et al., 2005, Leutert et al., 2012). D'autres études ont rapporté l'utilisation de la main gantée pour récupérer l'EV (Plöntzke et al., 2011, Toni et al., 2015). Pratiquement, l'utilisation de ces méthodes demeure spécifique au but de la recherche basée sur la nature de la maladie à investiguer. Ce qui pourrait

limiter variablement leurs avantages sur le plan pratique. Une revue systématique de littérature sur les approches expérimentales (plan expérimental, taille de l'échantillon, méthode d'échantillonnage, l'approche statistique) a noté une grande diversité entre les méthodes de diagnostic de l'EVP et de l'EC sur le terrain. Seulement 20% des articles scientifiques recensés traitaient à la fois les caractéristiques des tests, les seuils et les sources d'erreurs qui constituent des critères fondamentaux pour la sélection, l'application et interprétation des résultats des tests de diagnostic (Boer et al., 2014).

Ces critères permettent de mesurer les performances des méthodes de diagnostic de l'EVP et de l'EC, utilisées à grande échelle dans la gestion des MU. La sensibilité, la spécificité, la fréquence d'emploi, la répétabilité, la facilité d'application la mise en évidence de l'association entre les résultats et la performance de reproduction des vaches observées ont été les critères de choix les plus importants dans les différentes expériences antérieures (Gilbert et al., 2005, McDougall et al., 2007, Runciman et al., 2009). Vu le nombre important de critères de choix des méthodes de diagnostic parfois discutés dans la gestion des MU, dorénavant des recommandations basées principalement sur du type de maladie diagnostiquée ou de l'objectif de la recherche ont été émises après une révision de la littérature (Boer et al., 2014).

1.2.6.1 Diagnostic de l'écoulement vaginal purulent

Le diagnostic de pus dans l'EVP chez les vaches en PP est effectué principalement par la technique de metricheck (Denis-Robichaud and Dubuc, 2015, Ledgard et al., 2015, Bicalho et al., 2016). La vaginoscopie est aussi utilisée pour mettre en évidence la présence de pus dans le vagin (Gilbert et al., 2005, McDougall et al., 2007). D'autres ont rapporté l'utilisation simple de la technique de la main gantée qui permet de collecter le mucus et vérifier la présence de pus dans le vagin en PP (Toni et al., 2015). Dernièrement, les efficacités de metricheck, de la vaginoscopie et de la main gantée ont été répertoriées dans une revue (Boer et al., 2014).

1.2.6.1.1 Description de la technique de metricheck

Le dispositif metricheck est un outil efficace de détection de l'EVP chez les vaches laitières en postpartum. L'outil a été identifié et décrit par diverses sources scientifiques

(Gilbert et al., 2005, McDougall et al., 2007, Runciman et al., 2009). Le dispositif metricheck est composé d'une tige en acier inoxydable de 50 cm de long et 8 mm de diamètre avec une poignée et une cupule en caoutchouc noir semi-sphérique de 2,5 cm de diamètre aux extrémités (Runciman et al., 2009). De par ses caractéristiques physiques ci-dessus le metricheck est considéré comme facile à nettoyer et à désinfecter (McDougall et al., 2007). Le mode opératoire de metricheck consiste à faire avancer la cupule à travers les lèvres vulvaires nettoyées de la vache jusqu'à l'extrémité antérieure du vagin. Une fois dans le vagin, la poignée est légèrement surélevée pour mieux collecter l'écoulement vaginal avec la cupule et le tout est ensuite retiré du tractus pour apprécier les caractéristiques macroscopiques du mucus basées généralement sur l'odeur et le score de pus (Gilbert et al., 2005, McDougall et al., 2007).



Figure 1- Dispositif de metricheck utilisé pour diagnostiquer l'EVP chez les vaches laitières en postpartum

En pratique, les avantages et inconvénients du metricheck ont été rapportés. Généralement, la facilité et la rapidité d'utilisation de metricheck par rapport à d'autres techniques de diagnostic (vaginoscopie, main gantée) ont été entièrement partagées (Gilbert et al., 2005, McDougall et al., 2007). Spécifiquement, lorsqu'un grand nombre d'animaux doivent être examinés, le metricheck offre un meilleur avantage (McDougall et al., 2007). En revanche, le score optimal et le temps par rapport au vêlage ou au début du programme de sélection des vaches soumises à la technique de metricheck ont été discutés (McDougall et al., 2007).

Bref, le caractère essentiel sur l'appréciation de l'EVP à l'aide du metricheck est la présence de pus dont l'intensité varie selon le degré d'évolution de la maladie (Gilbert et al., 2005).

1.2.6.1.2 Description de la technique de vaginoscopie

La vaginoscopie a été récemment confirmée comme une technique pratique pour distinguer les vaches en bonne santé des vaches atteintes de l'EVP (Dubuc et al., 2010c). Une sensibilité de 53,9% et une spécificité de 95,4% de la technique vaginoscopique ont été rapportées par rapport à la technique de la cytologie endométriale utilisée comme test de référence (Barlund et al., 2008). La vaginoscopie a été identifiée dans une revue discutée comme l'une des trois principales techniques de diagnostic de l'EVP (Boer et al., 2014).

Le dispositif de vaginoscopie est composé d'un tube, d'une caméra et d'un spéculum. Contrairement à metricheck et à la main gantée la vaginoscopie permet d'explorer la lumière génitale du vagin jusqu'au col de l'utérus de la vache (Runciman et al., 2008, Wagener et al., 2017). En pratique, l'utilisation de la technique de vaginoscopie est jugée de recours rare par les cliniciens malgré sa simplicité et sa rapidité (Youngquist and Shore, 1997, LeBlanc et al., 2002).

1.2.6.1.3 Description de la technique de la main gantée

La technique de la main gantée est classifiée comme deuxième technique pour détecter l'EVP. La fréquence d'utilisation de la main gantée est estimée à 22% après le metricheck chez les vaches postpartum (De Boer et al., 2014). Contrairement à metricheck et à la vaginoscopie, la main gantée est cependant une technique manuelle (Plöntzke et al., 2011). Son mode opératoire consiste à insérer la main gantée (avec gantes larges descartables, Flex, Buenos Aires, Argentine) lubrifiée avec du gel utilisé pour les examens échographiques dans la lumière vaginale. Une fois dans le vagin, la main est ouverte dans une direction circulaire permettant de collecter le mucus. Puis la main est retirée, ouverte avec doigts écartés pour permettre de noter l'odeur et le score du mucus collecté comme indiqué avec le metricheck (Plöntzke et al., 2011).

Des expériences ont fait état de la simplicité d'utilisation et de la répétabilité élevée de la technique de la main gantée (Sheldon et al., 2002, Plöntzke et al., 2011). Toutefois, comparée aux autres techniques, la technique de la main gantée a été supposée plus sensible à détecter les vaches atteintes de l'EVP (Plöntzke et al., 2011). D'autres chercheurs aperçoivent la technique de la main gantée comme une méthode

interchangeable avec le metricheck et la vaginoscopie. Cependant, comme toute technique permettant de détecter l'EVP, la main gantée peut conduire à des résultats faussement positifs ou négatifs en cas de présence d'une vaginite, d'une cervicite, d'une cystite ou d'une néphrite purulente (Pleticha et al., 2009).

1.2.6.2 Diagnostic de l'endométrite cytologique

Plusieurs méthodes de diagnostic de l'EC pendant la PP ont été rapportées dans des études récentes. La cytobrosse, le lavage utérin à faible volume à l'aide d'une solution saline et l'estérase leucocytaire sont les plus couramment utilisés (Boer et al., 2014, Wagener et al., 2017). Les fréquences d'utilisation de la cytobrosse, le lavage utérin et l'estérase leucocytaire sont estimées respectivement de 46,0%, de 31,0% et 15,0% environ (Boer et al., 2014). Généralement, l'utilisation de ces techniques permet d'évaluer la réponse immunitaire par la proportion des PMN utérins associée à la fertilité des vaches reproductrices atteintes comparativement aux vaches indemnes (Boer et al., 2014). Les PMN sont considérés principalement comme les principaux indicateurs de la présence de l'EC lors du diagnostic chez les vaches en PP (Kasimanickam et al., 2005, Dubuc et al., 2011, Dubuc and Denis-Robichaud, 2017). En plus de l'infiltration des PMN, l'absence de signes cliniques chez les vaches atteintes de l'EC a été rapportée comme indicateur possible de l'EC par rapport aux autres MU (Knudsen et al., 2015).

1.2.6.2.1 Description de la technique de la cytobrosse

C'est une technique initialement développée du côté humain pour la détection du cancer du col utérin et la collection des échantillonnages des cellules cornéennes de l'œil (Wagener et al., 2017). L'application de la cytobrosse en gynécologie bovine a été faite pour la première fois en 2004 (Kasimanickam et al., 2004). La cytobrosse est décrite comme un dispositif composé d'un pinceau vissé sur une tige métallique, inséré dans un cathéter enveloppé dans un plastique pour maintenir l'hygiène du matériel pendant l'utilisation (Kasimanickam et al., 2004). Le mode opératoire consiste après montage du dispositif, à introduire le cathéter dans le corps de l'utérus de la vache sous contrôle rectal du col utérin de manière similaire à la procédure de l'insémination artificielle. Le cathéter une fois dans l'utérus, le pinceau est poussé vers l'avant et enroulé doucement le long de l'endomètre dans un seul sens afin d'éviter l'irritation de la muqueuse. Ensuite, le cathéter

est retiré doucement du tractus utérin et le pinceau est enroulé sur une lame de microscope servant de lecture de la population cellulaire présente (Kasimanickam et al., 2004, Gilbert et al., 2005, Wagener et al., 2017).

Des échantillons cervicaux et utérins collectés par la cytobrosse permettent d'évaluer les cellules inflammatoires ou la croissance bactérienne (Yavari et al., 2009, Deguillaume et al., 2012). L'avantage d'utilisation de la cytobrosse sur les autres techniques de diagnostic de l'EC a été justifié spécifiquement par son caractère non invasif et sa performance de prédire les performances reproductives futures des vaches (Kaufmann et al., 2009, Dubuc et al., 2011, Denis-Robichaud and Dubuc, 2015). Des preuves évidentes rapportées soulignent que la cytobrosse ne cause aucune incidence négative sur le taux de conception ultérieure des vaches reproductrices prélevées même si la collection des échantillons précède immédiatement l'insémination artificielle (Kaufmann et al., 2009). En principe, de par ses avantages, certaines études estiment que la cytologie utérine peut être utilisée présentement comme méthode de surveillance lors des visites de santé des troupeaux dans les exploitations ayant des problèmes de fertilité. Avec la technique de la cytobrosse, une prévalence de l'EC dans un sous-groupe de vaches peut être utilisée pour identifier et discuter des facteurs de risque de sous-fertilité dans une ferme donnée (Sheldon et al., 2009b, Boer et al., 2014, Wagener et al., 2017).

L'interprétation des résultats de la technique de la cytobrosse est pratiquement basée sur le seuil des PMN fixé par l'étude. Le seuil des PMN définit la limite de proportion des PMN à partir de laquelle la vache est considérée malade ou saine. Un répertoire de divers seuils des PMN utilisés sur le terrain pour apprécier des résultats cytologiques des réponses inflammatoires de l'utérus des vaches laitières en postpartum est établi et indiqué dans le tableau ci-après.

Tableau 1 - Seuils pour le diagnostic de l'endométrite cytologique et les prévalences chez les vaches laitières par référence bibliographique (Wagener et al., 2017)

Référence	Seuil des PMN (%)	Jours postpartum	Prévalence
Barlund et al., 2008	8	24-41	11,1
Barański et al., 2012	18	21-28	18,9 à 75,4
Cheong et al., 2011	10	40-60	4,8 à 52,6 ^a
Galvão et al., 2009	6,5	35	37,9 à 38,4 ^a
Gilbert et al., 2005	5	40-60	37,0 à 74,0 ^a
Kasimanickam et al., 2004	18	20-33	35,1
	10	34-47	34,0
Kaufmann et al., 2010	18	28-35	12,4
Madoz et al., 2013	5	21-62	17,0
Plöntzke et al., 2010	5	18-38	38,0
Ribeiro et al., 2013	5	46-52	13,4
Sens and Heuwieser, 2013	18	21-27	13,4

a. Les auteurs n'avaient pas exclu les vaches souffrant de l'EVP

1.2.6.2.2 Description de la technique de l'estérase leucocytaire

L'estérase leucocytaire (EL) est une technique d'évaluation de l'inflammation cytologique basée sur les réponses inflammatoires du tissu utérin. La technique repose sur l'utilisation des bandelettes réactives à l'EL. La procédure de la technique de l'EL consiste d'abord à plonger la cytobrosse coupée dans un petit volume de solution saline, ensuite, une bandelette réactive à l'EL. La lecture du résultat se fait par l'observation de la coloration de la bandelette et la comparaison avec une charte colorimétrique (Couto et al., 2013, Wagener et al., 2017).

1.2.7 Gestion de l'écoulement vaginal purulent et l'endométrite cytologique

1.2.7.1 Traitement

La présence fréquente des MU sur les fermes semble obliger la multiplication des efforts de lutte. Plusieurs approches de nature antimicrobienne, enzymatique, hormonale ou d'extraits de plantes ont été rapportées contre l'EVP et de l'EC chez les vaches en

postpartum (Runciman et al., 2009, Dubuc et al., 2011, Wagener et al., 2017). Les prostaglandines et les antimicrobiens locaux ou systémiques semblent les plus utilisés (Giuliodori et al., 2017, Wagener et al., 2017, Haimerl et al., 2018a). Pratiquement, les effets bactéricides des antimicrobiens et physiologiques des prostaglandines en reproduction semblent justifier le choix abondant des antimicrobiens et les prostaglandines (Dibrov et al., 2002, LeBlanc, 2008, Singh et al., 2017). Les antimicrobiens sont administrés aux vaches en postpartum dans l'utérus ou dans la circulation sanguine. L'infusion des antimicrobiens dans l'utérus vise à atteindre une concentration élevée au site de l'infection contrairement à la voie systémique qui permet d'obtenir une concentration de médicament dans l'endomètre. Actuellement, l'efficacité obtenue de toutes les approches de lutte existantes en termes de taux de guérison clinique de l'EVP et de l'EC et de performance de reproduction chez les vaches laitières affectées reste encore parfois discutée (Haimerl, 2013, Pascottini and Opsomer, 2016, Singh et al., 2017).

L'administration de l'acide cristallin de ceftiofur 24 heures après le vêlage et de dinoprost aux 35^e et 49^e JEL plus ou moins 3 jours, n'a montré aucun effet significatif du ceftiofur sur l'EC, mais l'EVP était réduit pendant le contrôle effectué au 35^e JEL plus ou moins 3 jours. Pour le dinoprost, aucun effet n'était constaté chez les vaches affectées contrairement aux témoins (Dubuc et al., 2011). Aussi, des vaches traitées à une dose de 0,5 g de céphapirine dans l'utérus aux 24 et 42^e JEL avant la saillie avaient présenté une amélioration des performances de reproduction et, cela, était particulièrement marquée même chez les vaches à antécédents de l'EVP, de rétention placentaire, mortinatalité de veau (McDougall et al., 2007). Certains chercheurs en revanche ont rapporté une amélioration des performances reproductives à la fois pour l'infusion intra-utérine de céphapirine et l'administration systémique des prostaglandines chez les vaches en postpartum positives de l'EVP et infectées par la bactérie *T. pyogenes* dans leur utérus (Pécsi et al., 2007). Cette déclaration était contraire aux résultats des méta-analyses en 2013 et 2018 de certains essais cliniques incluant les prostaglandines en termes d'amélioration des performances reproductives (Haimerl et al., 2018b, c). Une autre investigations a suspecté la persistance de l'EC même après la disparition des signes cliniques chez les vaches en PP (Sheldon et al., 2009b). En plus, une autre étude a même

rapporté des réductions du taux de gestation par suite de traitement aux prostaglandines chez les vaches sans corps jaune (LeBlanc, 2003).

En plus des antimicrobiens et les prostaglandines, autres approches de gestion de l'EVP et de l'EC ont été rapportées. Des traitements alternatifs à la solution de dextrose 50% ou enzyme protéolytique contenant de la trypsine, à la chymotrypsine et à la papaïne pour lutter contre l'EVP et de l'EC ont été rapporté (Brick et al., 2012). Également, une réduction de l'incidence de la rétention placentaire par une nouvelle phytothérapie chinoise Dang Hong Fu comme aqua-acupuncture a été documentée. Toutefois, les auteurs précisent que la confirmation d'effet nécessite d'études supplémentaires (Luo et al., 2010).

1.2.7.2 Prévention

S'agissant de la prévention de l'EVP et de l'EC, quelques actions ont été proposées, mais elles sont presque limitées à la réduction des facteurs de risques à travers des conseils généraux sur l'hygiène au vêlage, l'administration de l'alimentation adéquate en supplémentant les rations en calcium, en sélénium ou en vitamine E. Ces approches ont donné des effets positifs, mais discutés (Drillich et al., 2006, Dubuc et al., 2011, Wagener et al., 2017).

En conclusion, plusieurs approches de gestion de l'EVP et de l'EC ont été initiées et appliquées sur le terrain avec prédominance des antimicrobiens et des prostaglandines., Cependant, à l'état actuel, l'efficacité rapportée en termes de guérison clinique et performance de reproduction des vaches après traitement semble controversée avec des impacts marqués par des prévalences toujours croissantes associées aux effets économiques.

1.2.8 Impacts de l'écoulement vaginal purulent et l'endométrite cytologique

Des effets néfastes majeurs d'ordre à la fois sanitaire, de bien-être et économiques dus à l'EVP et à l'EC dans les élevages laitiers ont été rapportés. Toutefois, ces effets varient d'un troupeau à l'autre, d'une étude à l'autre ou d'un milieu géographique à un autre. Des taux réduits de conception à la première insémination, des pertes de production en lait dues aux résidus des antibiotiques souvent administrés aux vaches malades en PP où l'infertilité complète des vaches occasionnée par des contaminations chroniques à long

terme ont été fréquemment rapportées (Roche et al., 2000, Gilbert et al., 2005, Molina-Coto and Lucy, 2018). Dans une étude les vaches positives de l'EVP au 35^e JEL plus ou moins 3 jours étaient 0,6 fois moins susceptibles de devenir gestantes à la PI par rapport aux vaches négatives. Aussi, les effets négatifs sur le risque de conception future des vaches affectées étaient additifs avec un allongement de l'intervalle de temps vêlage-conception jusqu'à 300 jours en moyen chez environ 30,0% des vaches observées (Dubuc et al., 2011). Autres effets similaires ont été notés, mais avec un nombre de JEL ouvert moyen non différent à la PI entre les vaches primipares et multipares respectivement 69,8 jours et 68,0 jours.

Pour l'EC, une différence significative ($p < 0,01$) du nombre de JEL ouvert moyen a été rapportée à 44 jours de plus par rapport aux vaches multipares sans l'EC. Toutefois, les vaches avec l'EC, en général, avaient plus de temps moyen de jours ouverts 142 (IC95% : 119;159) que les vaches négatives 116 (IC95% : 110;124) et la différence était significative ($p = 0,02$) (Cheong et al., 2011).

Section 3 - Description du pegbovigrastim

Dans cette section, nous allons nous intéresser aux caractéristiques pharmacologiques et immunologiques fondamentales du pegbovigrastim qui constitue notre molécule d'essai clinique pour la prévention de l'EVP et de l'EC chez les vaches laitières en postpartum. L'application du pegbovigrastim dans cette étude sera effectuée conformément aux recommandations en termes d'efficacité et de sécurité animale, humaine, alimentaire, environnementale et technologique des produits pharmaceutiques et biologiques vétérinaires devant être utilisés au Canada et en Europe (Arpinelli and Bamfi, 2006, de Vlieger et al., 2019).

1.3.1 Définition du pegbovigrastim et notion de pégylation

Le pegbovigrastim ou facteur de stimulation des colonies de granulocytes bovins (bG-CSF) pégylé a été décrit comme une « cytokine » immunomodulatrice endogène conjuguée au polyéthylène glycol (PEG) spécialisé dans le rétablissement des fonctions immunitaires bactéricides et la production des PMN à partir des précurseurs de la moelle osseuse chez les vaches laitières en péripartum (Canning et al., 2017). Ainsi, le bG-CSF

est un produit biologique modifié de la cytokine bovine naturelle et dont le mécanisme d'action est une réponse immunologique autre que celle associée à une maladie infectieuse. L'agence européenne des médicaments souligne que l'idée de pégylation du bG-CSF était de permettre une activité biologique soutenue du bG-CSF. La pégylation consiste à attacher les unités répétitives de PEG à un médicament polypeptidique comme le bG-CSF (Harris and Chess, 2003). D'autres sources ont rapporté que le rattachement des chaînes de PEG aux médicaments protéiques permet de surmonter leurs lacunes technologiques liées à leur dégradation par les enzymes protéolytiques ou à leur rapide élimination par les reins à cause de leur courte demi-vie circulante (Harris and Chess, 2003, Hirotsu et al., 2017). Le PEG est un polymère synthétique composé de sous-unités répétitives d'oxyéthylène, qui est connu pour sa bonne solubilité dans l'eau, sa non-toxicité, sa non-immunogénicité, sa non-antigénicité et son approbation dans les applications pharmaceutiques (Zhang et al., 2020). Des études ont rapporté que la technique de pégylation a permis de redéfinir ces dernières années l'importance clinique de nombreuses biomolécules (Hirotsu et al., 2017, Magharla, 2017).

En santé humaine, la technologie de pégylation des médicaments a été bien rapportée. Le but est d'assurer l'efficacité des médicaments protéiques utilisés contre les défaillances des réponses immunitaires des patients soumis particulièrement à la chimiothérapie (Harris and Chess, 2003). L'année 1990 a marqué le début de cette révolution technologique caractérisée par une traduction des connaissances de la biologie fondamentale par des progrès en médecine clinique (Harris and Chess, 2003, Rhodes, 2018). Par exemples, le pegademase (Adagen) pour le traitement de l'immunodéficience combinée sévère, le pegaspargase (Oncaspar) pour traitement de la leucémie lymphocytaire aiguë, de la leucémie lymphoblastique aiguë et de la leucémie myéloïde chronique dues à la chimiothérapie, ont été tous développés l'année 1990. Aussi, il y a eu en 2001 le peginterféron $\alpha 2b$ pour le traitement de l'hépatite C ou encore le pegfilgrastim une forme de filgrastim pour la stimulation de la production de PMN épuisés par la chimiothérapie anticancéreuse (Harris and Chess, 2003).

En santé animale, le bG-CSF comme d'autres molécules récemment développées en médecine vétérinaire a contribué également à l'avancement des connaissances vétérinaires

dans la gestion préventive des mammites cliniques chez les vaches laitières en PP exposées à l'immunosuppression (Rhodes, 2018). Le bG-CSF est une molécule thérapeutique nouvelle. La limite maximale de résidus dans les aliments d'origine animale a été adoptée en 2012 en Europe, en 2015 aux États-Unis et en 2016 au Canada pour la prévention des mammites cliniques au cours des 30 premiers JEL. Le premier essai clinique du bG-CSF a été réalisé en 2014 chez les vaches laitières Holsteins en postpartum (Kimura et al., 2014). La production du bG-CSF est effectuée actuellement par diverses industries pharmaceutiques notamment, Eli Lilly and Company limite en Europe, Elanco aux États-Unis et au Canada. Sur le marché, le bG-CSF est commercialisé sous le nom de Imrestor (Imrestor, Elanco Animal Health, Greenfield, IN).

1.3.2 Description des caractéristiques

1.3.2.1 Présentation, conservation et utilisation

Le bG-CSF se présente en solution injectable transparente, incolore à jaune pâle, composé de 15 mg de PEG par seringue. La conservation du produit est conseillée entre 2 et 8°C au réfrigérateur. Lorsque son utilisation est prévue dans les 24h, la conservation du bG-CSF pourrait se faire à 25°C. Le protocole standard de traitement de bG-CSF consiste à l'administration de deux injections par animal au 7^e jour avant et pendant les 24h après le vêlage en sous-cutané dans le contexte des mammites cliniques. Pendant les manipulations, il est conseillé de ne pas agiter les seringues afin d'éviter de réduire son activité biologique. Durant le traitement, l'intervalle de temps entre les deux injections ne doit pas être inférieur à 3 jours ou supérieur à 17 jours. Cela permet de éviter des incidences liées à la surdose du bG-CSF et d'atteindre une meilleure efficacité thérapeutique selon les constats établis sur le produit. Les vaches laitières primipares et multipares sont les catégories ciblées par l'application du bG-CSF.

Bref, le bG-CSF est ni vaccin, ni antibiotique et ni hormone, mais plutôt une protéine messagère que l'on peut retrouver à l'état naturel et qui est responsable de la régulation des neutrophiles.

1.3.2.2 Rôle immunomodulateur et efficacité approuvée

Pratiquement, nombreux essais cliniques du bG-CSF ont été réalisés chez les différentes catégories de vaches laitières en péripartum dans des fermes de diverses localités depuis son premier essai clinique (Kimura et al., 2014, Canning et al., 2017, Van Schyndel et al., 2018). L'objectif principal de tous ces essais était de prévenir les mammites cliniques. L'action immunologique du bG-CSF semble reposer sur une production accrue des PMN matures à partir des cellules souches de la moelle osseuse et l'activation de leur capacité fonctionnelle permettant de stimuler le système immunitaire (Kimura et al., 2014, McDougall et al., 2017, Van Schyndel et al., 2018).

L'évolution de la variation du nombre des PMN lors d'un traitement de bG-CSF chez les vaches laitières en péripartum a été comparée à des vaches contrôlées par une solution saline physiologique de concentration 0,9% (Van Schyndel et al., 2018). Le nombre absolu des PMN circulants après administration du bG-CSF au jour 7 avant et 24h suivant le vêlage était significativement différent ($p > 0,05$) entre les groupes. Le nombre de PMN a cumulé triplement 24h après la première injection et multiplié environ par 7 après la deuxième injection au jour du vêlage. Les vaches expérimentales avaient gardé une concentration maximale de PMN durant 3 semaines après la première injection (Van Schyndel et al., 2018).

En termes d'efficacité, un fait très intéressant rapporté par une étude est que l'augmentation significative des PMN entraînée par un traitement de bG-CSF ne change pas même en cas de dénutrition prépartum des vaches laitières traitées (McDougall et al., 2017). Une autre étude a rapporté que le traitement de bG-CSF peut avoir un effet plus persistant contre la mammite clinique par rapport à la molécule habituelle naturelle c'est-à-dire la molécule non pégylé (Kimura et al., 2014). Actuellement, l'efficacité confirmée du bG-CSF contre la mammite clinique est relative d'une étude à une autre de 25 à 35% de réduction de risque de mammite clinique (Canning et al., 2017, Ruiz et al., 2017b, Zinicola et al., 2018). Par exemple, un essai clinique randomisé réalisé dans 4 laiteries commerciales composées de vaches Holsteins a rapporté une réduction de 35% de la prévalence de mammite clinique chez les vaches traitées de bG-CSF par rapport aux vaches témoins. Également, une réduction de 52% des échecs de retour à l'œstrus des

vaches en PP au cours des 80 premiers JEL (Canning et al., 2017). Une autre étude randomisée réalisée dans 17 troupeaux mexicains composés de vaches Holsteins a rapporté une réduction de la prévalence de 25% de mammite clinique et de 6% le nombre de traitements médicaux chez les vaches traitées par rapport aux vaches témoins. Le rapport de côte d'avoir une mammite au cours des 30 premiers JEL était de 35% pour les vaches témoins. Aussi, la probabilité d'être inséminée dans les 100 premiers JEL était plus importante (6%) chez les traitées par rapport aux vaches témoins. En revanche, les auteurs avaient rapporté une augmentation de 17,1% de la prévalence de métrite (Ruiz et al., 2017a).

Quant aux fonctions des PMN, différents tests de phagocytose, de l'exocytose ou chimiotactisme, etc. des PMN produits par le traitement bG-CSF contre les agents pathogènes microbiens ont été évalués entre des vaches traitées de bG-CSF et des vaches témoins. À présent, les résultats obtenus de ces tests de fonctions des PMN produits paraissent discutables suivant les études. Une étude a rapporté une augmentation considérable des PMN circulants chez les traitées de bG-CSF, mais, leurs fonctions étaient similaires à celles des vaches témoins sur une base individuelle à l'exception de l'exocytose de l'enzyme myéloperoxydase qui était particulièrement améliorée de manière significative chez les vaches traitées de bG-CSF (Kimura et al., 2014). La myéloperoxydase est un composant important dans l'arsenal antimicrobien des PMN (Winterbourn et al., 2000). Le peroxyde d'hydrogène et l'acide hypochloreux confèrent aux PMN leurs propriétés antimicrobiennes (Lanza, 1998, Klebanoff et al., 2013). Elle est même supposée comme mesure de quantification de l'accumulation tissulaire des PMN (Schierwagen et al., 1990).

1.3.2.3 Association du pegbovigrastim avec autres médicaments

Sur le terrain, l'utilisation du bG-CSF doit se faire dans le respect des principes d'éthique clinique. Cela permet d'atteindre l'effet réel au cours des essais cliniques. Il est rapporté que l'administration concomitante du bG-CSF avec des corticostéroïdes ou anti-inflammatoires non stéroïdiens est déconseillée. Ces substances peuvent agir sur les PMN et altérer leurs fonctions immunitaires devant être dirigées contre les agents pathogènes microbiens. Par ailleurs, la sécurité et l'efficacité du bG-CSF concomitamment avec les

vaccins n'ont pas encore été documentées. Il a été cependant supposé que l'action du bG-CSF peut avoir des effets supplémentaires directs ou indirects sur d'autres types et récepteurs cellulaires ainsi que sur les voies de signalisation associées aux cytokines, mais il manque de preuves suffisantes sur ces informations (Ruiz et al., 2017a).

En conclusion, le bG-CSF est une molécule immunomodulatrice récemment introduite dans les programmes de gestion des pathologies associées aux déficiences immunitaires chez les vaches laitières en PP dans les grands troupeaux laitiers. À l'étape actuelle, selon les résultats des essais cliniques réalisés, le bG-CSF s'est avéré efficace pour prévenir les mammites cliniques à cause de son apport pour le renforcement du système immunitaire des vaches en péripartum. Cependant, aucune preuve de son efficacité n'existe contre l'EVP et l'EC dont les vaches en PP sont exposées. Une étude a supposé que d'autres effets du bG-CSF sur le risque d'autres maladies reproductives et infectieuses chez les vaches en PP peuvent encore être obtenus (Van Schyndel et al., 2018).

Section 4-Objectifs et hypothèses de recherche

L'objectif général de ce projet de recherche était d'évaluer l'effet de l'administration de pegbovigrastim (bG-CSF) pour prévenir l'EVP et l'EC chez les vaches laitières durant la période postpartum. Pour vérifier cet objectif, nous nous sommes fixé les objectifs spécifiques suivants :

1. Évaluer l'effet du pegbovigrastim administré aux 14^e et 21^e jours en lait sur l'écoulement vaginal purulent et de l'endométrite cytologique au 35^e jour

A ce niveau, il était supposé que les vaches laitières en postpartum ayant reçues le traitement de bG-CSF aux 14^e et 21^e JEL étaient moins exposées au risque de l'EVP et l'EC que les vaches laitières en postpartum ayant reçues la saline physiologique au 35^e JEL. Autrement dit, l'administration du bG-CSF deux semaines avant la survenue supposée de l'EVP et de l'EC permettrait d'obtenir un nombre de PMN plus viable empêchant le développement et la colonisation du milieu utérin des vaches laitières en postpartum par les agents pathogènes microbiens ayant transgressé dans l'utérus pendant le vêlage ou les jours après le vêlage.

2. Évaluer l'effet du pegbovigrastim sur les performances de reproduction des vaches suivant leur statut sanitaire utérin au cours des 120 premiers JEL

Ici, l'hypothèse est que les vaches laitières en postpartum traitées avec le bG-CSF avant le début de l'EVP et de l'EC présentent des taux d'insémination et de gestation plus élevés avec un nombre de JEL ouverts plus réduit par rapport aux vaches laitières en postpartum traitées avec la saline au cours des 120 premiers JEL. En outre, l'efficacité du bG-CSF pourrait être traduite par une amélioration des performances de reproduction des vaches laitières en postpartum.

3. Répertorier les incidents produits dans les deux groupes de vaches laitières en postpartum traitées sur une période de 120 premiers JEL

Dans cette partie de l'étude, nous supposons que les incidents survenus dans le groupe des vaches laitières en postpartum traitées avec le bG-CSF le bG-CSF sont semblables à ceux du groupe des vaches laitières en postpartum ayant reçues la saline physiologique. Nous appelons incidents dans cette recherche les cas d'élimination survenus au cours de la période de 120 premiers JEL de l'étude et les différentes raisons liées à ces éliminations notamment les symptômes cliniques observés sur chaque vache concernée

Chapitre 2 - Méthodologie de recherche

2.1 Conception de l'étude

Ce projet pilote est un essai clinique randomisé, à double aveugle, contrôlé par un placebo pour évaluer l'efficacité du bG-CSF à prévenir l'EVP et de l'EC chez les vaches laitières en postpartum. Au total, un nombre de 60 vaches laitières en postpartum a été réparti aléatoirement entre le groupe contrôle (saline, n = 29) choisi comme placebo et le groupe traitement (bG-CSF, n = 31) pour réaliser ce projet pilote de recherche. L'étude a été divisée en trois parties distinctes, mais cliniquement complémentaires. La première partie de l'étude consistait à examiner comment le bG-CSF prévenait l'EVP et l'EC. La deuxième partie de l'étude consistait à examiner comment le bG-CSF influençait la capacité de reproduction des vaches en postpartum et leur éventuelle survie dans le troupeau. Pour cette partie, des données ont été collectées sur chaque vache enrôlée jusqu'à son 120^e JEL. Quant à la troisième partie de l'étude, elle consistait à évaluer la sécurité de l'utilisation du bG-CSF avec ce présent protocole chez les vaches laitières en postpartum. Ensuite, les données ont été analysées et les résultats ont été comparés entre les deux groupes en ce qui concerne les performances reproductives des vaches et les incidences éventuelles de réforme.

2.2 Définition des critères de jugement des résultats

Afin d'évaluer l'effet du bG-CSF dans ce présent essai clinique, nous nous sommes intéressés à un certain nombre de critères liés à la fois à la santé utérine et reproductive des vaches après leur vêlage. Parmi ces critères, le principal est la prévalence de l'EVP et de l'EC au 35^e JEL. La mesure de la prévalence est associée à la tendance de scores de l'EVP, de l'EL et de la proportion des leucocytes polymorphonucléaires (PPMN) mesurant les réponses immunitaires du tractus génital des vaches. Les critères secondaires sont l'intervalle vêlage-première insémination (IVPI); la proportion de vaches inséminées avant 120 JEL, ainsi que le succès à la première insémination (SPI) à 120 JEL de suivi des vaches et le nombre de vaches éliminées de l'étude dans chaque groupe ainsi les raisons ayant conduit à ces éliminations.

2.3 Choix du placebo ou traitement de référence

Pour évaluer l'efficacité du bG-CSF pour la prévention de l'EVP et de l'EC, nous avons choisi la saline physiologique injectable qui est une solution de chlorure de sodium à 0,9% de concentration (NaCl 0,9%). Plusieurs caractéristiques de NaCl 0,9% ont été rapportées. C'est une solution stérile composée de sodium et de l'eau, cliniquement apyrogène et pouvant être administré en intraveineuse comme en sous-cutanée. L'utilisation de NaCl 0,9% dans le domaine médical demeure soutenue au premier rang. NaCl 0,9% a permis d'assurer la mise en évidence de l'efficacité et/ou de l'innocuité des nouveaux produits pharmaceutiques candidats sur le marché (Awad et al., 2008, Li et al., 2016).

2.4 Sélection de la ferme enrôlée

Pour la présente étude, un troupeau laitier commercial d'un effectif important (n=300 vaches en lactation) de race Holstein, localisée à 50 km de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal a été enrôlé. Elle utilisait systématiquement un protocole de synchronisation de l'ovulation pour la première saillie. Cette ferme a été sélectionnée par convenance pour sa capacité de fournir le nombre de vaches fixé dans notre protocole de recherche et sa facilité de collaboration de celle-ci avec l'Université de Montréal dans le cadre du présent projet de recherche.

2.5 Enrôlement et examen physique des vaches

Les vaches Holsteins primipares et multipares saines n'étant pas sous traitement pour quelques raisons que ce soit ou n'ayant pas été traitées dans les 14 derniers jours ont été enrôlées de façon séquentielle dans l'étude au 14^e JEL en utilisant le logiciel Lac-T (logiciel de gestion du troupeau). Les vaches présentant une anomalie à l'examen physique complet au jour de l'enrôlement ont été exclues de l'étude. Les vaches traitées entre 14^e et 35^e JEL avec un médicament possédant des propriétés anti-inflammatoires ou antimicrobiennes ont également été exclues vu le possible effet de ces types de médicaments sur les résultats attendus de notre étude. Au total, 60 vaches laitières primipares et multipares étaient prévues d'enrôler. Par suite de leur enrôlement, l'identifiant, le nombre de lactations, la date du vêlage, la présence d'une rétention

placentaire pendant plus de 24 heures suivant le vêlage ont été notés. Les vaches ont été aléatoirement réparties dans un des 2 groupes suivants : 1) contrôle (saline) ou 2) traitement (bG-CSF).

2.6 Traitement et observations des vaches

Au début de l'essai clinique, des seringues médicales de plastique transparent ont été préremplies avec 2,7 ml de saline (Irrigation, Baxter Corp. Mississauga, Ontario, Canada) ou du bG-CSF (Imrestor, Elanco Animal Health, Greenfield, IN). Ensuite, chaque seringue a été identifiée aléatoirement avec un nombre situé entre 1 et 60 inclusivement généré aléatoirement à l'aide de la fonction aléatoire du logiciel Excel en choisissant des bornes min = 1 (code de traitement saline) et max = 2 (code de traitement bG-CSF). Finalement, 30 numéros ont été assignés aléatoirement à chaque code de traitement donné. Pour favoriser une évaluation en double aveugle, les seringues commerciales du bG-CSF et prêtes à l'emploi ont été transvasées dans des seringues identiques aux celles utilisées pour la saline de telle manière qu'on ne pouvait pas distinguer entre la saline et le bG-CSF. Tous les observateurs, incluant le producteur ou ses employés, étaient donc à l'aveugle lors de l'utilisation des produits de traitement.

Après l'enrôlement de chaque vache, son traitement est pré-assigné aléatoirement de NaCl 0,9% stérile ou du bG-CSFG qui ont été administrés par injection sous-cutanée au niveau du creux de la croupe conformément aux recommandations requises (Meinert, 2012). Chaque vache a reçu son traitement à deux reprises, soit aux jours 14 et 21 après le vêlage (figure 2). Durant la période de traitement, les vaches ont été observées une fois par semaine par le responsable du projet et quotidiennement par les éleveurs pour identifier et recenser des éventuelles réactions post-traitement afin de mieux contribuer à la compréhension des caractéristiques de bG-CSF.

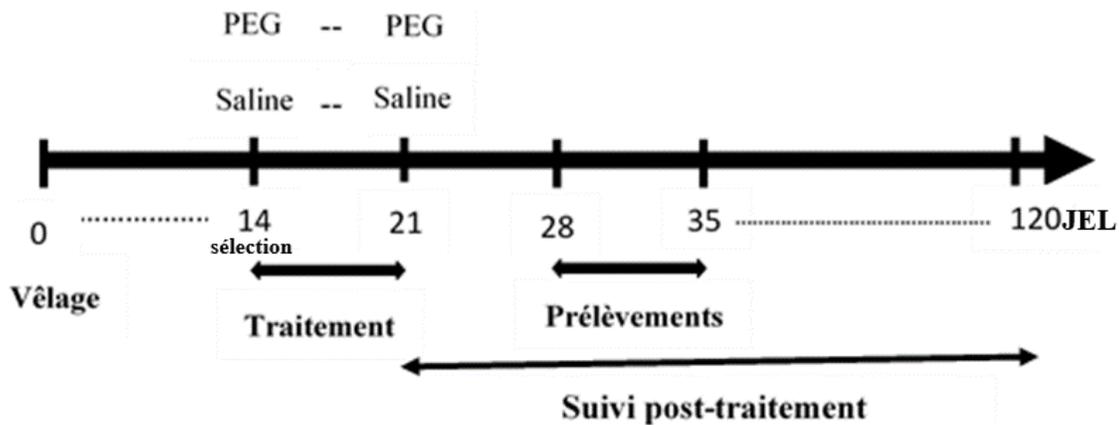


Figure 2- Schéma du protocole expérimental de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins en postpartum lors de l'étude clinique

2.7 Collecte et examens des échantillons de mucus du tractus génital

Après traitement et suivi des vaches, la collecte des échantillons de mucus vaginal et utérin a été faite sur toutes les vaches en postpartum ayant reçu les deux injections et ne présentant aucun signe prédéfini faisant l'objet d'exclusion et cela conformément aux méthodes de diagnostic utilisées. La collecte des échantillons a été effectuée dans des conditions propres. D'abord, le périnée et la vulve ont été nettoyés avec des serviettes en papier bien trempées dans de l'eau savonneuse chez chaque vache avant toute manipulation de prélèvement.

2.7.1 Collecte du mucus vaginal et examen physique

D'abord, l'écoulement vaginal a été examiné par le prélèvement d'un échantillon de mucus du vagin a été prélevé chez chaque vache enrôlée à l'aide de l'outil metricheck bien nettoyé dans de l'eau savonneuse (Dubuc and Denis-Robichaud, 2017). Lors du retrait du Metricheck du vagin de la vache, le contenu du godet a été apprécié en termes d'odeur, de consistance et de couleur. Un score a été utilisé pour quantifier l'aspect visuel de l'écoulement (Williams et al., 2005). Un certain volume a parfois été transvasé dans des flacons de collecte lorsque la quantité était importante afin de mieux apprécier les caractéristiques susmentionnées.

Le score de pus dans l'EV a été la principale caractéristique de classification finale des vaches malades ou non malades dans les deux groupes d'étude. Les vaches ont été

classifiées selon les critères d'appréciation en une échelle de quatre niveaux: score 1 pour les vaches négatives n'ayant aucun mucus ou avec mucus clair, score 2 pour les vaches présentant un mucus clair avec des flocons de matières purulentes, score 3 pour les vaches ayant de mucus purulent, mais inférieur à 50%, et 4 pour les vaches avec mucus purulent de score de pus supérieur à 50% par rapport au volume total collecté. Une vache a été déclarée positive lorsque son score de pus dans le volume de mucus collecté était supérieur ou égal à 3 et négative pour un score de pus inférieur ou égal à 2 (Williams et al., 2005).

Après le metricheck, un échantillon du mucus utérin a été prélevé chez chaque vache avec la technique de cytobrosse comme décrite par (Kasimanickam et al., 2004). En bref, une cytobrosse (Gynobrush; Heinz Herenz, Hambourg, Allemagne) vissée sur une tige métallique et protégée par un cathéter en plastique ainsi qu'un manchon en plastique a été inséré dans la cavité utérine de chaque vache à l'aide de la palpation rectale afin de bien diriger l'orientation et la progression la tige dans l'utérus. Une fois le dispositif introduit, le manchon en plastique est percé en avant et retiré. La brosse est ensuite enroulée le long de l'endomètre dans un seul sens de manière très douce afin d'éviter un trauma utérin tout en raclant le mucus. Ensuite, la brosse a été retirée dans le cathéter métallique afin d'éviter la contamination par le reste du tractus génital du col aux vulves souillées par le reste des matières émises pendant même le prélèvement.

Une fois le matériel complètement retiré du tractus, immédiatement, des lames cytologiques ont été préparées en roulant simplement chaque brosse sur une lame de microscope en verre propre, séchée et bien identifiée par le nom de la ferme suivi des initiales du responsable du projet, le numéro de la vache et la date de prélèvement afin de faciliter la gestion des données (Dubuc and Denis-Robichaud, 2017).

Au laboratoire, les lames ont ensuite été fixées à l'alcool, puis colorées avec un colorant de Wright-Giemsa modifié (Hemma3, Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ) un maximum de 12 heures suivant la collecte des échantillons à la ferme (Westermann et al., 2010, Dubuc and Denis-Robichaud, 2017).

2.7.2 Examen microscopique des lames

Pour diagnostiquer l'EC, le pourcentage des PMN a été déterminé dans une population de 100 cellules y compris les cellules endothéliales comptées au microscope à grossissement 400X. Une proportion supérieure ou égale à 6% de PMN a été définie comme seuil de l'EC pour sa bonne valeur de corrélation avec les performances reproductives des vaches diagnostiquées entre le 28^e et le 35^e JEL (Dubuc and Denis-Robichaud, 2017). La lecture des lames a été faite par un seul observateur expérimenté. La répétabilité inter-observateurs n'a pas été évaluée.

2.7.3 Test d'estérase leucocytaire

Immédiatement, après avoir roulé la brosse sur lame de verre pour le frottis cytologique, la poignée de la cytobrosse a été coupée à environ 6 cm et la brosse a été introduite dans un flacon individuel de 3 ml de capacité contenant 1 ml de NaCl 0,9% (Irrigation, Baxter Corp. Mississauga, Ontario, Canada). Une bandelette commerciale de leucocytes estérase (Multistix 10 SG, Bayer Corporation, Elkart, IN) a été introduite dans le flacon pour le test d'estérase leucocytaire effectué à la ferme (Denis-Robichaud and Dubuc, 2015).

Une fois la brosse plongée, le flacon de la solution NaCl 0,9% a été agité pendant 10 secondes afin de bien imbiber entièrement la bandelette de leucocyte estérase. Les résultats du test ont été lus après 2 minutes selon les recommandations du fabricant sous une échelle de scores de l'estérase leucocytaire (ScEL) de 0 pour le ScEL nul, de 1 pour le ScEL de petite quantité (traces), de 2 lorsque le ScEL est modéré et enfin 3 pour le ScEL élevé par rapport à celle habituelle. Pour l'interprétation, une vache a été considérée positive à l'EC lorsque le ScEL était supérieur ou égal à 1 et négative en dessous de score 1 (Denis-Robichaud and Dubuc, 2014). Enfin, les prévalences de l'EVP et de l'EC ont été calculées pour chaque condition respectivement en divisant le nombre de vaches positives par le nombre total de toutes les vaches.

2.8 Suivi et collecte de données de reproduction et d'incidences

Afin d'évaluer l'effet du traitement de bG-CSF sur les performances de reproduction et ses possibles effets indésirables sur la vie des vaches dans le futur, d'abord une collecte de données sur le nombre de jours de l'IVPI a été effectuée. Ensuite, le nombre de jours de

l'IVSF et le SPI ont été aussi collectés jusqu'en 120^e JEL chez toutes les vaches enrôlées. Également, durant la période d'investigation, les vaches éliminées et les différents motifs ont été enregistrées. Les données du logiciel de gestion du troupeau ont été recueillies systématiquement à chaque deux semaines lors de la visite de l'équipe de recherche à la ferme.

2.9 Gestion, validation et analyse statiques des données

Après la collecte, nous avons défini tout d'abord les variables à mesurer et enregistré toutes les données dans Microsoft Access afin d'éviter la redondance à l'aide d'une clé unique permettant de faire le lien entre les requêtes créées. Ensuite, le fichier Access a été entré dans les logiciels statistiques SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) et R où les données ont été validées et analysées. Le traitement des données manquantes a été effectué automatiquement par SAS ou R en attribuant un point à chaque valeur manquante. Le traitement et l'analyse des données ont été effectués de manière itérative. Avant d'entreprendre toute description ou analyse statistique des données, des vérifications ont été effectuées en explorant le nombre de données valides et de données manquantes pour chaque variable continue et catégorique. Par exemple, vérifier les valeurs minimales et maximales, les centiles, etc. pour détecter toute donnée aberrante ou visualiser la distribution de fréquence des différentes catégories pour vérifier si elle est probable et pour détecter les catégories redondantes et choisir des tests statistiques appropriés afin d'évaluer l'association entre les variables évaluées (Dohoo et al., 2009).

Pour la validation des résultats de la santé utérine des vaches et succès à la reproduction, les tests de Khi^2 et de Fisher ont été utilisés pour comparer les résultats des prévalences de l'EVP et de l'EC, des proportions de gestation et du nombre de jours médians ouverts entre le vêlage et l'insémination dans les deux groupes (Wang et al., 2003, Dohoo et al., 2009). Les valeurs de p des tests ont été comparées à la valeur seuil (0,05) de signification choisie pour définir les niveaux de signification statistique de nos résultats obtenus.

Ensuite, l'analyse de survie a été effectuée et le test de Log Rank a été utilisé pour comparer la différence du nombre le temps en jours de l'IVPI, l'IVC et l'intervalle

traitement-élimination (ITE) entre le groupe saline et le groupe bG-CSF avec le logiciel R.
Enfin, tous nos résultats ont été rapporté approximés au dixième près.

Chapitre 3 – Présentation des résultats de recherche

3.1 Description des échantillons de vaches à l'étude

3.1.1 Distribution des populations de vaches

Au total, 60 vaches (n=29 pour saline et n=31 pour bG-CSF) sans conditions physiques et sanitaires particulières ont été enrôlées et incluses progressivement dans cette étude du 15 juillet 2019 au 25 novembre 2020, avec certains temps de rupture à cause de la pandémie COVID-19 qui a occasionné la suspension de toutes les activités de recherche au Québec. La parité des vaches variait globalement de 1 à 9 (tableau 2) avec une prédominance de primipares qui représentaient plus de 50% dans chaque groupe.

Tableau 2- Distribution des caractéristiques réelles des groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins entre 28^e et 35^e JEL dans un essai clinique randomisé

Groupe de traitement	Variable	Statistiques descriptives					P
		Min	25 ^e centile	Médiane	75 ^e centile	Max	
Saline n=29	Parité	1	1	2	5	9	Référence
	JEL ^b à l'examen reproducteur	28	30	32	34	37	Référence
bG-CSF^a n=31	Parité	1	1	2	2	7	0,30
	JEL à l'examen reproducteur	29	30	33	34	37	0,23

a = pegbovigrastim, b = jours en lait

Ce tableau présente et compare les caractéristiques principales et communes incluses des deux groupes de vaches traitées. Le groupe saline avait plus de vaches à parité inférieure, mais les deux groupes n'étaient différents avec la valeur de $p > 0,05$ seuil de signification choisi. Aussi, les deux groupes n'étaient pas différents en ce qui concernant leur JEL à l'examen reproducteur post-traitement avec la valeur de $p > 0,05$ seuil de signification.

3.2 Effet du pegbovigrastim sur l'endométrite

3.2.1 Réponses immunitaires utérines

Tableau 3- Distribution des réponses immunitaires utérines des groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins entre 28^e et 35^e JEL dans un essai clinique randomisé

Groupe de traitement	Variable	Statistiques descriptives					
		Min	25 ^e centile	Médiane	75 ^e centile	Max	P
Saline n=29	ScEVP ¹	1	1	1	2	4	Référence
	ScEL ²	0	0	2	3	3	Référence
	PPMN ³	1	1	4	14	98	Référence
bG-CSF^a n=31	ScEVP	1	1	1	1	3	0,10
	ScEL	0	1	2	2	3	0,20
	PPMN	1	2	3	12	98	0,40

a = pegbovigrastim, 1 = score d'écoulement vaginal purulent, 2 = score d'estérase leucocytaire, 3 = proportion de leucocytes polymorphonucléaires

Ce tableau inclut et compare les trois réponses immunitaires utérines notées après traitement dans les deux groupes. La fréquence des réponses immunitaires était similaire dans les deux groupes avec les valeurs de $p > 0,05$ niveau de signification choisi.

3.2.2 Prévalence de l'EVP et de l'EC

3.2.2.1 Prévalence globale

Les prévalences globales des formes d'endométrite déclarées entre 28^e et 35^e JEL après traitement étaient respectivement 13,3% (IC95% : 5,9 ; 24,6) pour EVP évalué au score de plus supérieur ou égal à 3 ; 40,0% (IC95% : 27,6 ; 53,5) pour EC à PMN évaluée à la PPMN supérieure ou égale à 6% et 70,0% (IC95% : 56,8 ; 81,2) pour EC à EL évaluée au score de l'EL supérieur ou égal à 1. L'incertitude des estimations de prévalence de l'endométrite était moins importante pour l'EVP.

3.2.2.2 Prévalence par traitement

Les figures suivantes présentent et comparent les prévalences de l'EVP et de l'EC obtenues aux seuils des mesures indiqués plus haut, classifiées par groupe de traitement.

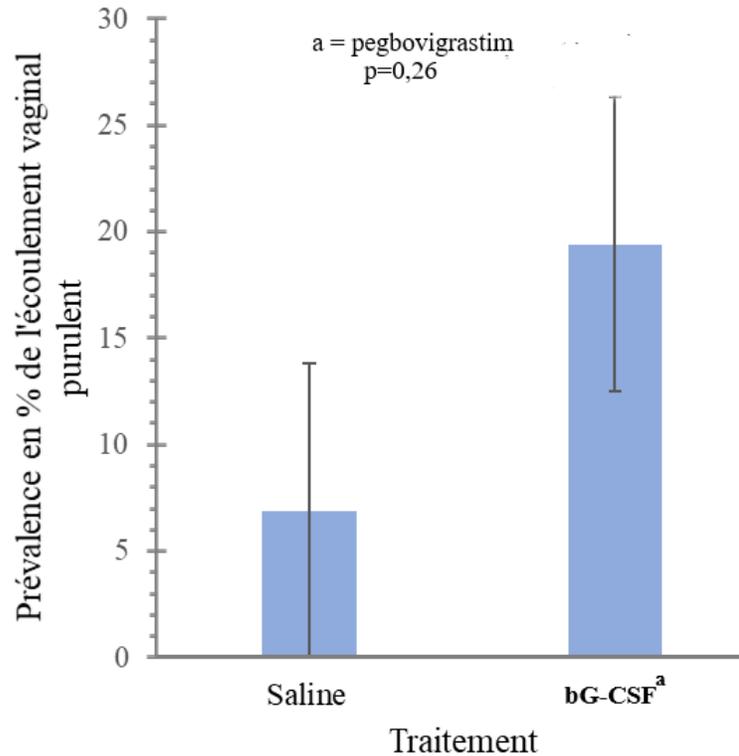


Figure 3- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur la prévalence de l'EVP chez des vaches laitières Holsteins entre 28^e et 35^e JEL dans un essai clinique randomisé

Cette figure compare les prévalences de l'EVP défini par la présence de pus au score supérieur ou égal à 3, contenu dans l'EV de chaque vache des deux groupes. La différence de l'EVP dans les deux groupes de vaches n'était pas statistiquement significative (p=0,26).

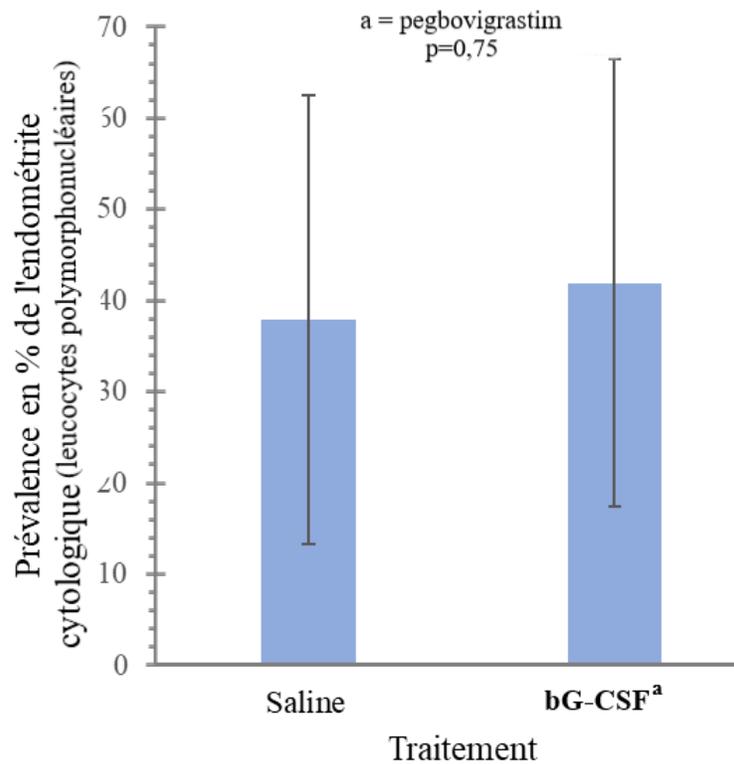


Figure 4- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur la prévalence de l'EC à PMN chez des vaches laitières Holsteins entre 28^e et 35^e JEL dans un essai clinique randomisé

Ici, nous avons la comparaison des prévalences de l'EC définies par la présence des PMN à une proportion supérieure ou égale à 6% obtenue dans un total de 100 cellules y compris celles épithéliales, comptées dans le mucus utérin au microscope des vaches des deux groupes. La différence observée entre les prévalences dans les deux groupes n'était pas statistiquement significative (p=0,75).

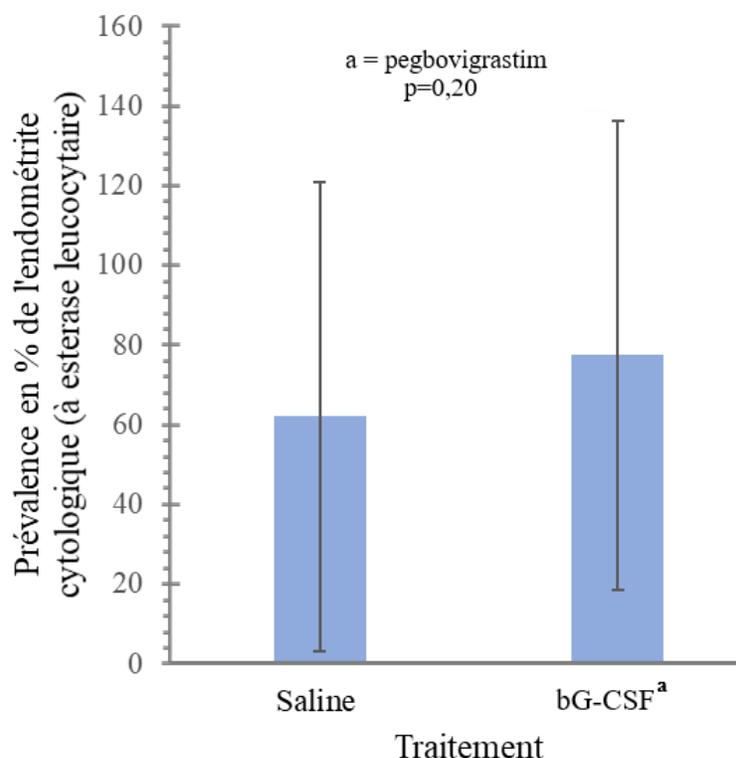


Figure 5- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur la prévalence de l'EC à l'EL chez des vaches laitières Holsteins entre 28^e et 35^e JEL dans un essai clinique randomisé

Sur cette figure, on observe les taux de prévalence de l'EC identifiée par la présence d'une quantité d'EL supérieure ou égale à 1 dans le mucus utérin des vaches des deux groupes. La différence observée entre les deux prévalences dans les groupes n'était pas statistiquement significative ($p=0,20$).

3.2.3 Risque de l'EVP et de l'EC

Le risque de l'EVP estimé était 3,3 fois plus élevé chez les vaches traitées avec bG-CSF, mais l'intervalle de confiance de 95% (0,6 ; 10,0) autour du RC contenait la valeur 1 qui indique l'effet nul de traitement bG-CSF. Quant à l'EC, son risque de survenue était respectivement 2 fois plus élevé pour l'EC à EL et 1,1 fois plus élevé pour l'EC à PMN chez les vaches traitées avec bG-CSF mais les IC95% respectifs 0,7 ; 5,0 et 0,4 ; 3,33 contenaient tous la valeur 1 indiquant l'effet nul du bG-CSF.

3.3 Effet du pegbovigrastim sur les performances de reproduction

3.3.1 Intervalle vêlage-première insémination

Tableau 4- Jours en lait (JEL) entre vêlage-première insémination des groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers jours en lactation dans un essai clinique randomisé

Groupe de traitements	Statistiques descriptives					P
	Min	25 ^e centile	Médiane	75 ^e centile	Max	
Saline n=29	47	58	63	68	87	0,33
bG-CSF ^a n=31	46	57	64	69	80	

a = pegbovigrastim

Ce tableau décrit et compare les intervalles de temps entre le vêlage et la première insémination (IVPI) des vaches ayant été inséminées dans les deux groupes de traitement. La période observée entre vêlage et insémination était plus courte pour les vaches du groupe bG-CSF, mais la différence n'était significative avec la valeur de p du temps médian supérieure à 0,05.

3.3.2 Proportion de vaches ayant une première insémination

3.3.2.1 Proportion globale

En général, les deux groupes de vaches de l'étude avaient enregistré une proportion importante d'insémination au cours de la période de suivi, soit 88,3% (53/60) avec un IC95% (77,4 ; 95,2%) peu étendu.

3.3.2.2 Proportions par groupe de traitement

Les proportions de vaches inséminées par groupe après traitement sont comparées dans la figure ci-après.

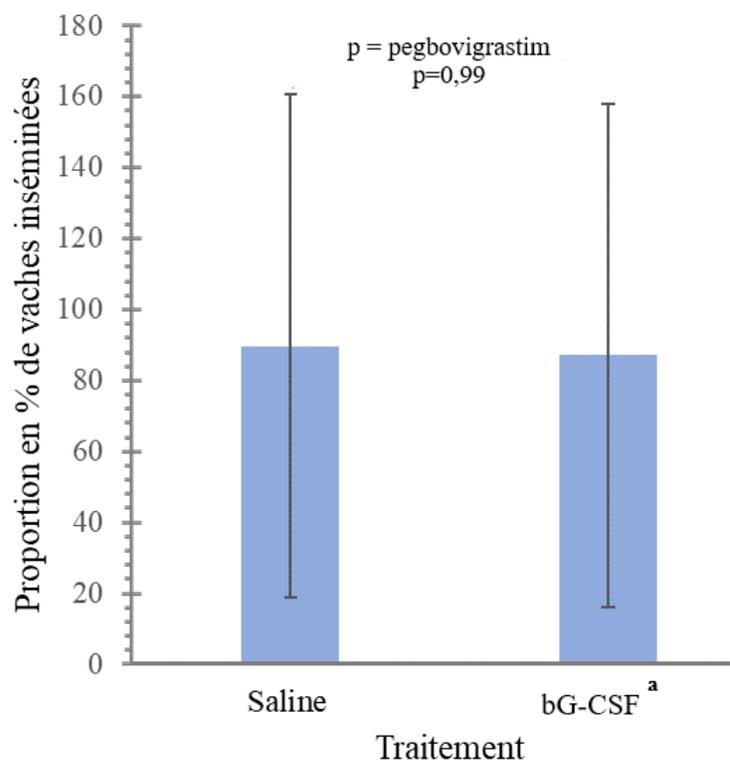


Figure 6- Effet de traitement (salie et bG-CSF) sur la proportion de vaches laitières Holsteins ayant reçues une insémination au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

Le groupe saline avait une proportion de vaches inséminées plus élevée 89,7% (26/29) par rapport à celui de bG-CSF qui avait 87,1% (27/31), mais la différence n'était pas statistiquement significative (p=0,99). Aussi, nous avons noté que la probabilité qu'une vache soit inséminée dans le groupe bG-CSF par rapport au groupe saline était de 0,8, mais l'IC95% (0,2 ; 3,3) contenait la valeur 1 indiquant l'effet nul du bG-CSF.

3.3.3 Distribution des jours en lactation à l'insémination

Recensement de vaches censurées

Au terme des 120 JEL de suivi, 11,7% (7/60) (3 vaches du groupe saline et 4 vaches du groupe bG-CSF) de l'effectif total des vaches étaient censurés. Nous avons sur la figure7 la modélisation du temps global d'insémination des vaches des deux groupes.

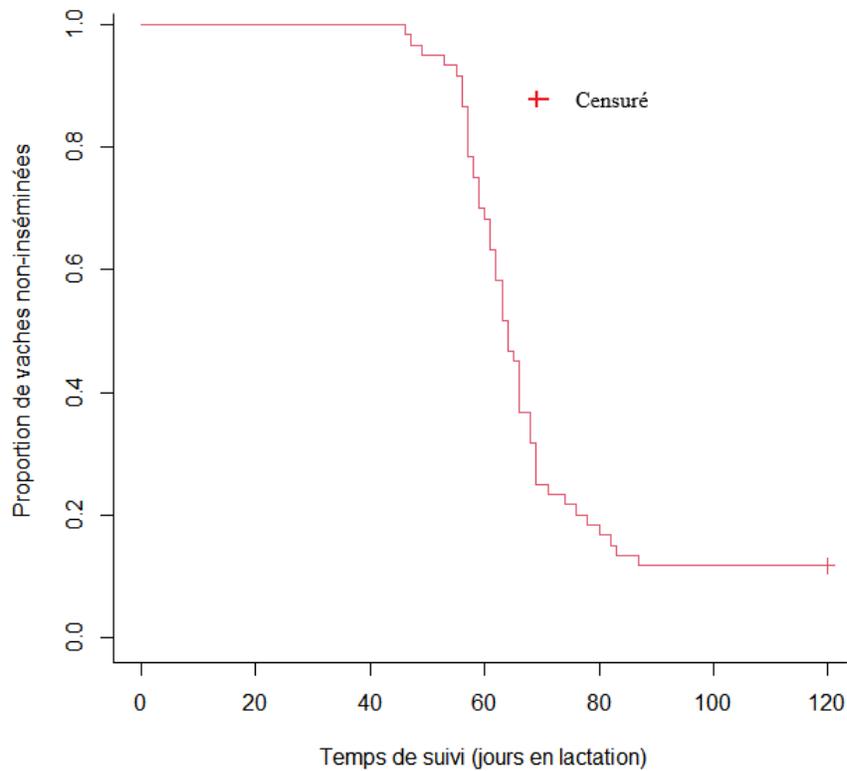


Figure 7- Courbe de survie de Kaplan-Meier de JEL à l'insémination des deux groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

Globalement, au 120^e JEL, environ 15% des vaches seulement n'avaient pas été inséminées. L'insémination av débuté le 46^e JEL et s'est terminée au 87^e JEL pour la totalité des vaches. Les vaches n'ayant pas été inséminées pour quelque raison que ce soit étaient censurées seulement à la fin du suivi. Généralement, on remarque que 50% des vaches étaient déjà inséminées avant le 65^e JEL. Les détails de cette proportion stratifiée par traitement se trouvent représentés dans la figure ci-dessous.

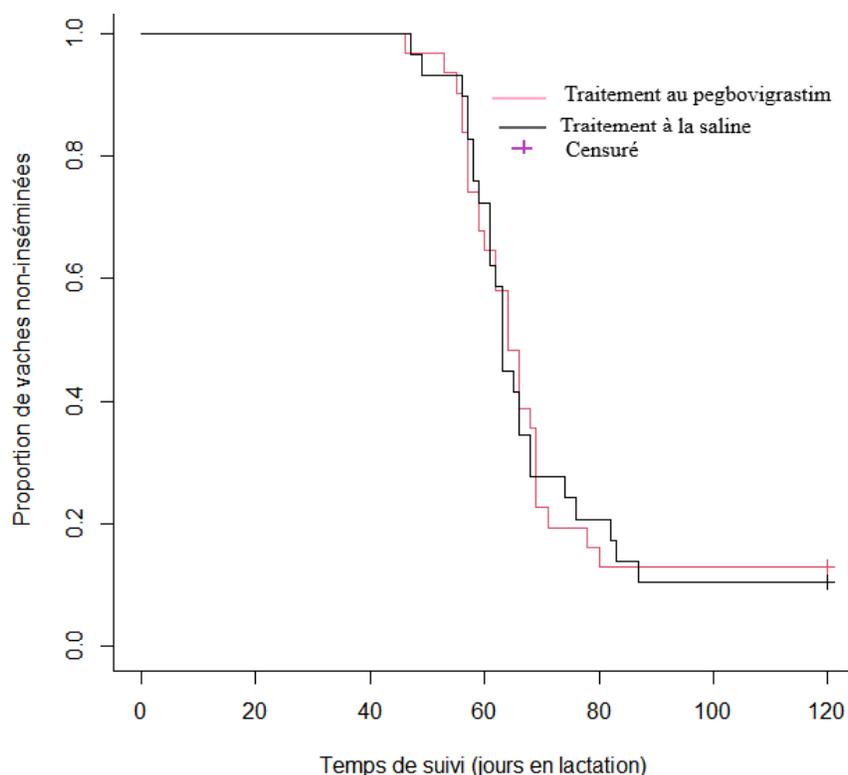


Figure 8- Courbes de survie de Kaplan-Meier de JEL à l'insémination par traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

Ce graphique compare les proportions de vaches inséminées par période de suivi entre le groupe saline et le groupe bG-CSF. Les deux courbes se chevauchent, ce qui indique que les proportions d'insémination enregistrées n'étaient pas différentes entre les deux groupes de vaches traitées au cours de la période de suivi. Aussi, nous avons constaté que le nombre médian de jours de l'IVPI était similaire, 63 jours (IC95% : 61 ; 68) pour les vaches traitées avec la saline et 64 jours (IC95%: 59 ; 69) pour les vaches traitées avec le bG-CSF ($p= 0,91$).

3.3.4 Succès à la première insémination

3.3.4.1 Succès global

Au cours des 120 premiers JEL, les deux groupes de vaches ont enregistré un succès global de gestation de 33,9% (18/53) inférieur à 50% avec un IC95% de 21,5 à 48,3%.

3.3.4.2 Succès par traitement

Les succès de gestation obtenus au cours des 120 premiers JEL par groupe de traitement sont présentés dans cette figure.

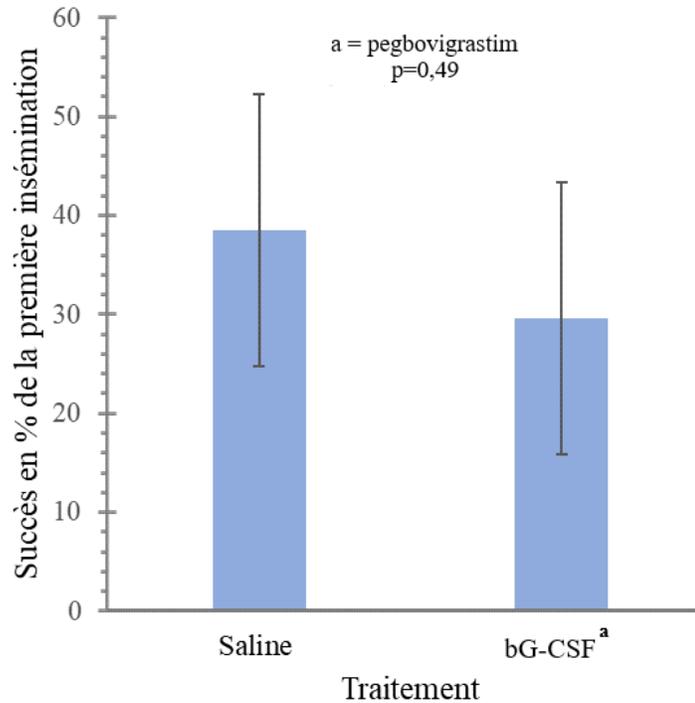


Figure 9- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur le succès à la première insémination chez des vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

Numériquement, les vaches traitées avec la saline avaient plus de vaches gestantes à 120 JEL soit 38,5% (10/26) par rapport à celles du groupe bG-CSF qui n'avaient que 29,6% (8/27) de gestation, mais la différence n'était pas statistiquement significative ($p=0,49$). Aussi, la probabilité qu'une vache soit gestante dans le groupe bG-CSF par rapport au groupe saline était de 0,8, mais l'IC95% (0,2 ;3,3) de RC contenait 1 qui est la valeur nulle de l'effet du bG-CSF.

3.3.5 Distribution des jours en lait à la gestation au cours du suivi

Recensement des censures

Au total 70,0% (42/60) des vaches, composé de 19 vaches traitées avec saline et 23 vaches traitées avec bG-CSF étaient censurées à 120 JEL. La modélisation des jours en lactation à la gestation globale des vaches est présentée dans cette figure.

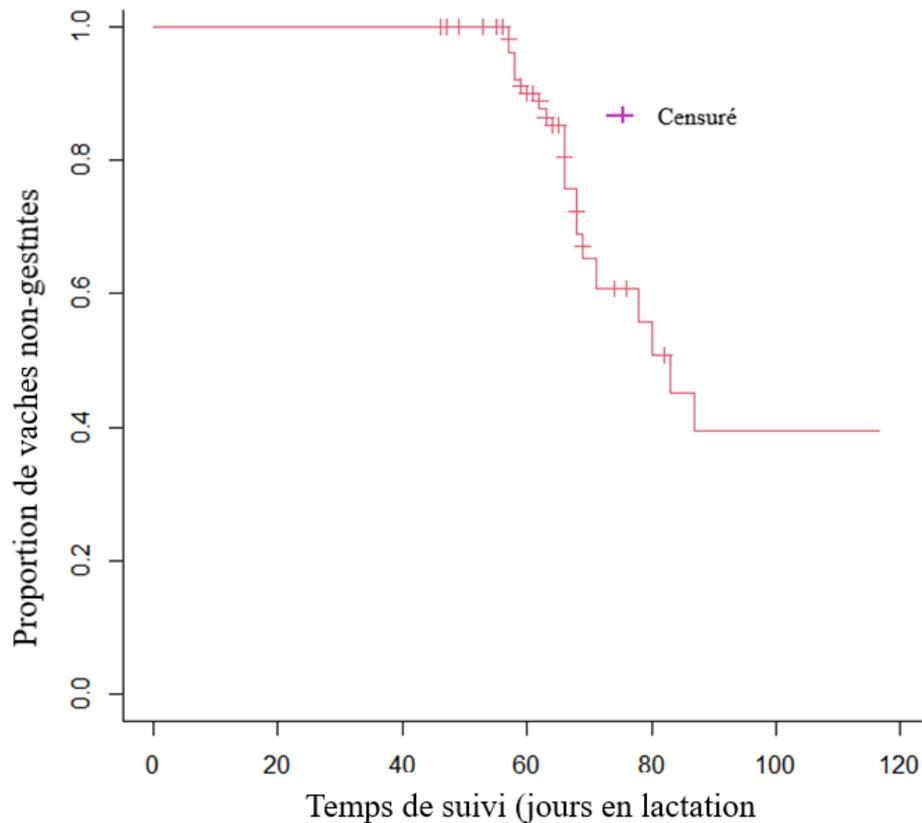


Figure 10- Courbe de survie de Kaplan-Meier de JEL à la gestation des deux groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

On remarque qu'en général aucune vache n'était devenue gestante avant le 45^e JEL. Plus de 50% des gestations avaient déjà lieux avant le 80^e JEL, mais il n'y avait pas eu d'autres gestations après le 87^e JEL jusqu'à la fin du suivi. La fréquence des censures était plus importante entre 40^e et 65^e JEL et les toutes dernières étaient observées au 82^e JEL.

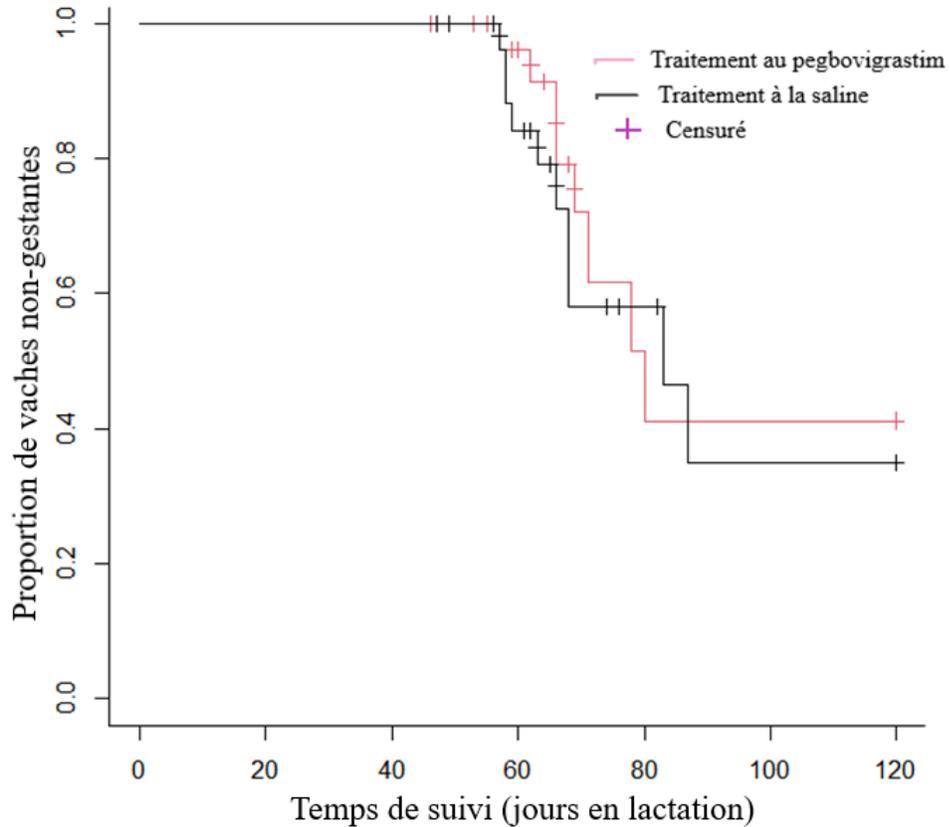


Figure 11- Courbes de survie de Kaplan-Meier de JEL à la gestation par traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

Ce graphique illustre et compare le temps de survie des gestations entre le groupe saline et le groupe bG-CSF. Le nombre médian de jours en lactation à la gestation était 83 pour les vaches du groupe saline et 80 pour les vaches du groupe bG-CSF, mais la différence de temps de survie entre les deux groupes n'était pas statistiquement significative ($p=0,56$). Les proportions de censures à 120 JEL étaient 32% et 38% respectivement pour le groupe saline et pour le groupe bG-CSF.

3.4 Incidences enregistrées après traitement au cours des 120 premiers JEL

Après l'administration de la saline physiologique et le bG-CSF aux vaches, quelques rares incidences remarquables marquées par l'élimination de certaines vaches de l'étude ainsi que leurs causes ont été répertoriées au cours du temps de suivi. Dans le tableau suivant sont indiqués les temps de survenu des différents cas d'élimination des vaches par groupe de traitement

3.4.1 Intervalle vêlage-élimination

Tableau 5- Distribution du temps entre vêlage et élimination par traitement (saline et bG-CSF) des vaches laitières Holsteins en postpartum dans un essai clinique randomisé

Groupe de traitement	Statistiques descriptives					P
	Min	25 ^e centile	Médiane	75 ^e centile	Max	
Saline n=29	101	101	103	104	104	0,20
bG-CSF ^a n=31	82	82	82	82	82	

Ce tableau contient et compare les données de l'intervalle vêlage-élimination (ITE) des vaches par groupe. Le temps médian entre le vêlage et l'élimination des vaches dans les deux groupes de traitement était similaire (p=20).

3.4.2 Proportions de vaches éliminées durant la période de suivi

3.4.2.1 Proportion globale

Globalement, le nombre de vaches éliminées était faible dans les deux groupes, 5,0% (3/60 ; IC95% : 1,0 ; 14,0) seulement n'avaient pas terminé l'étude au terme du suivi.

3.4.2.2 Proportion par traitement et causes liées

Les proportions de vaches inséminées par groupe de traitement sont représentées et comparées dans la figure ci-après.

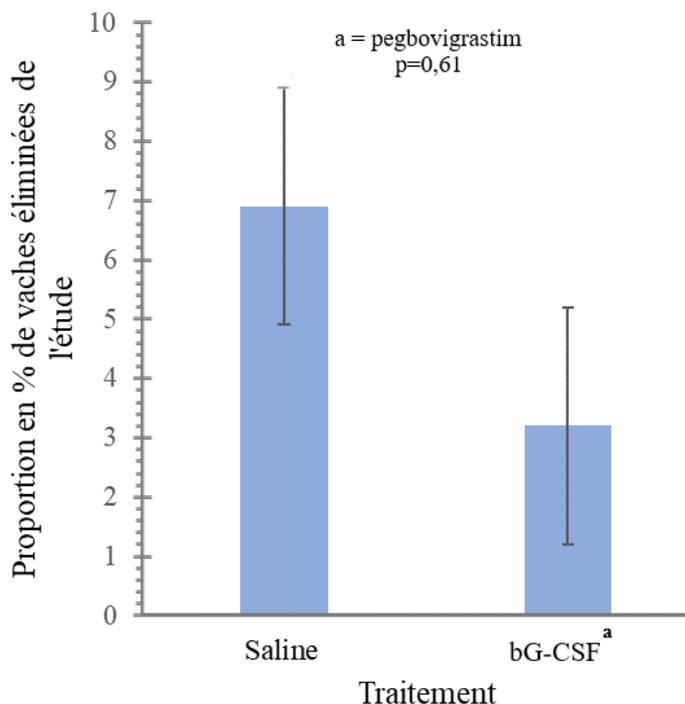


Figure 12- Effet de traitement (saline et bG-CSF) sur l'élimination des vaches laitières Holsteins au cours des 120 JEL dans un essai clinique randomisé

La proportion de vaches éliminées par groupe de traitement dans le troupeau au cours des 120 premiers JEL était 6,9% (2/29) et 3,2 (1/31) respectivement pour le groupe saline et le pour le groupe bG-CSF, mais la différence n'était pas statistiquement significative ($p=0,61$). Aussi, la probabilité qu'une vache soit éliminée dans le groupe bG-CSF par rapport au groupe saline était de 2,3, mais l'IC95% (0,2 ; 26,0) de RC contenait 1 qui est la valeur nulle de l'effet du bG-CSF. L'élimination des deux vaches du groupe saline était due à la réforme et la vente. Pour la vache du groupe bG-CSF, la cause de l'élimination était due au trouble de locomotion constaté après l'administration de la première injection. Les graphiques suivants donnent le temps d'élimination des vaches au cours du suivi.

3.4.3 Distribution des vaches éliminées dans le temps

Recensement des censures

Au total, il y a eu seulement 3 vaches retirées de l'étude au courant de la période de suivi, c'est-à-dire du début du premier traitement de chaque vache jusqu'à 120 JEL où nous avons censuré 95,0% (57/60) de l'effectif total composé de 30 vaches du groupe bG-CSF

et 27 vaches du groupe saline. Les distributions globales et par traitement des vaches éliminées de l'étude sont représentées dans les figures ci-dessous.

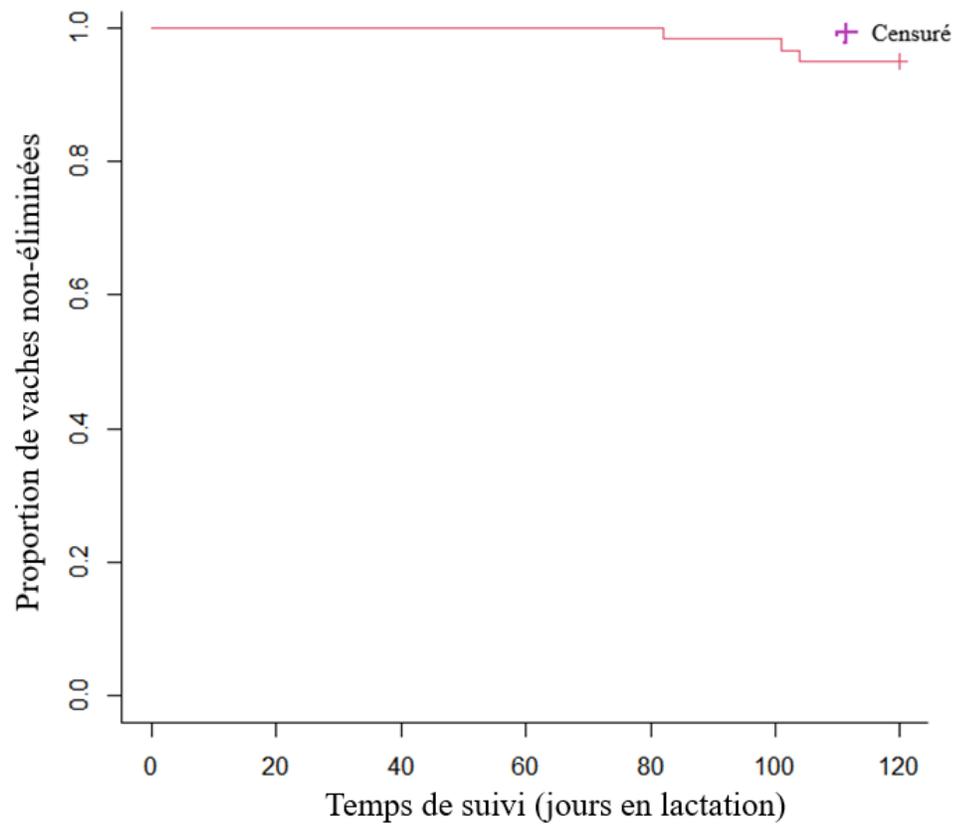


Figure 13- Courbe de survie de Kaplan-Meier de JEL à l'élimination dans les deux groupes de traitement (saline et bG-CSF) de vaches laitières Holsteins au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

Sur ce graphique de Kaplan-Meier, on voit que 3 vaches étaient éliminées de l'étude après 80^e JEL et leur censure a été faite au 120^e JEL. Dans la figure suivante, nous avons choisi de représenter le risque d'élimination et non pas la proportion des vaches non éliminées.

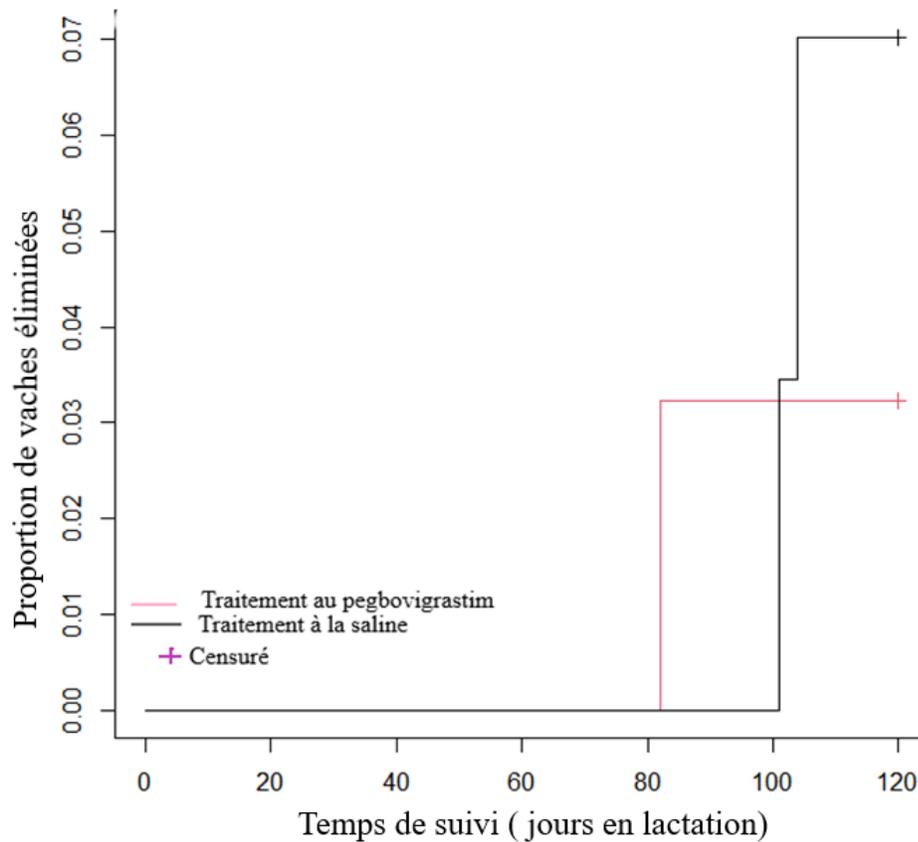


Figure 14- Courbes cumulatives d'élimination des vaches laitières Holsteins par traitement (saline et bG-CSF) au cours des 120 premiers JEL dans un essai clinique randomisé

Ce graphique nous présente et compare le risque d'élimination ou simplement l'incidence cumulée entre les deux groupes de traitement. On voit que le risque était variable selon le groupe de traitement. En lecture verticale, nous voyons que le risque d'élimination au 83^e JEL dans le groupe bG-CSF était de 0,03 et 0 dans le groupe saline. Au 103^e JEL, le risque d'élimination des vaches était 0 pour le groupe bG-CSF et 0,03 pour le groupe saline. L'évaluation de différence de temps de risque selon le traitement montre qu'il n'y avait aucune différence entre les deux groupes ($p=0,53$).

Chapitre 4 - Discussion générale

Cette étude est à la connaissance des auteurs, la première à avoir investigué sur l'efficacité du bG-CSF administré aux 14^e et 21^e JEL sur la prévention de l'EVP et de l'EC chez les vaches laitières Holsteins en postpartum. Deux groupes de vaches ont été comparés dont l'un a reçu deux injections de bG-CSF aux 14^e et 21^e JEL et l'autre deux injections de la saline physiologique (traitement de référence) aux mêmes moments. L'étude a été menée autour de trois parties indiquées dans la méthodologie notamment, la santé utérine, la reproduction et les incidences survenues. Dans cette section, nous comparons d'abord nos résultats avec ceux de la littérature, puis nous discutons des forces et faiblesses de notre étude, et enfin du futur de l'étude.

Distribution des réponses immunitaires utérines

Dans notre étude, nous avons constaté que les résultats des réponses immunitaires de l'utérus tels que le ScEVP, le ScEL et la PPMN de l'utérus observés deux semaines après le traitement au bG-CSF au 21^e JEL dans les deux groupes étaient tous variables numériquement. Les vaches du groupe bG-CSF avaient des valeurs médianes de ScEVP, de ScEL et de PPMN similaires à celles des vaches du groupe saline. Nos résultats étaient comparables à celles des études antérieures réalisées sur des vaches laitières Holsteins en postpartum, mais avec un protocole de traitement différent, soit une semaine avant et au cours des 24h suivant le vêlage; aussi, les essais étaient réalisés contre la mammite clinique associée similairement à l'immunosuppression péripartum (Van Schyndel et al., 2018, Zinicola et al., 2018, Galvão et al., 2019). Ensuite, nous avons constaté avant le début de notre projet qu'aucune étude n'avait utilisé à la fois les trois méthodes de diagnostic à savoir le metricheck, l'estérase leucocytaire et la cytobrosse pour apprécier l'efficacité du bG-CSF contre les MU en général et l'EVP et l'EC particulièrement; ce qui dénote le caractère novateur de notre d'étude sur l'effet de l'administration du bG-CSF sur la prévention de l'EVP et de l'EC.

Prévalence de l'EVP et de l'EC

Les résultats de notre étude ont montré que le bG-CSF n'avait pas eu d'effet sur les incidences de l'EVP et de l'EC. Les prévalences de l'EVP, de l'EC à EL et de l'EC à PMN chez les vaches du groupe saline respectivement de 6,9% (2/29), 62,1% (18/29) et 37,9%

(11/29) étaient moins élevés par rapport à celles obtenues chez les vaches du groupe bG-CSF respectivement 19,4% (6/31), 77,4% (24/31) et 41,9% (13/31), mais il n'y avait aucune différence significative. En comparant nos résultats à ceux des études antérieures, nous constatons que la relation est relativement similaire dans le contexte des MU. Jusqu'à présent, parmi les MU, seuls l'EVP et la métrite ont été évalués après le traitement de bG-CSF. Pratiquement, tous les essais ont été consacrés à la détermination du nombre des PMN et leurs fonctions immunitaires. Une étude a rapporté des prévalences similaires de 13,4% pour la métrite au 35^e JEL, mesurées au seuil de scores de pus supérieur ou égal à 2 (Galvao et al., 2019). Dans notre étude nous avons utilisé une valeur seuil supérieure ou égale à 3 parce que nous avons supposé qu'avec l'augmentation des PMN, occasionnée par le bG-CSF, la quantité de débris cellulaires pouvait être surestimée. Une autre étude a rapporté aussi l'augmentation significative de l'incidence de métrite après l'administration du bG-CSF de 17,1% chez les vaches traitées en postpartum. Les auteurs ont associé cette augmentation de l'incidence de la métrite simplement au mode d'action du bG-CSF qui augmente la réponse neutrophilique conduisant à des signes inflammatoires plus clairement visualisés (Ruiz et al., 2017b). Dans d'autres études en revanche, la différence de l'incidence de métrite n'était pas notable entre les vaches traitées et celles contrôles ($p > 0,05$) (Canning et al., 2017, Zinicola et al., 2018). Par ailleurs, pour le cas de mammite clinique nous n'avons pas obtenu des résultats similaires avec d'autres études qui ont rapporté des réductions de l'incidence de la maladie de 25 à 35% chez les vaches laitières au cours de 30 premiers JEL (Canning et al., 2017, Ruiz et al., 2017a).

Performance de reproduction au cours des 120 premiers jours postpartum

Dans notre étude, nous avons constaté que les vaches ayant été traitées avec le bG-CSF avaient présenté des performances de reproduction plus faibles même si aucune différence significative entre les groupes n'avait été notée. En prenant tout d'abord l'intervalle de temps entre vêlage et première insémination (IVPI), le résultat était variable d'un groupe à l'autre et les vaches du groupe bG-CSF avaient un temps médian de 64 jours comparativement aux vaches du groupe saline qui avaient 63 jours. Ce constat était différent de celui d'une étude qui a observé un temps médian plus long en jours chez le groupe témoin 104 jours contre 103 jours pour les vaches du groupe bG-CSF. Nous avons

supposé que cette différence de temps médian semble être due simplement à la différence de durée de suivi entre les deux études, 180 JEL dans leur étude et 120 JEL dans notre étude d'une part et d'autre de la période d'administration du bG-CSF 7 jours avant et au cours des 24h du vêlage (Zinicola et al., 2018).

Dans notre essai, nous avons constaté que les vaches traitées avec le bG-CSF avaient un taux d'insémination à la première saillie plus faible (87,1%; 27/31) par rapport à celles contrôles (89,7%; 26/29), mais sans différence significative. Nos résultats n'étaient pas cohérents avec ceux d'une étude qui avait enregistré une augmentation des chances d'insémination chez les vaches laitières avec le bG-CSF au cours des 100 premiers JEL avec plusieurs autres conditions bénéfiques (Ruiz et al., 2017a). Quant au SPI, une étude a rapporté des taux de 28,8% de succès pour les vaches du groupe saline contre 34,3% pour celles traitées avec le bG-CSF, mais il n'y avait aucune différence significative (Zinicola et al., 2018). Nous avons constaté que nos résultats étaient différents de ceux rapportés par une autre étude qui avait enregistré plutôt un succès plus élevé chez les vaches contrôles de 38,5 (10/26) contre 29,6% (8/27) pour celles du groupe bG-CSF (Zinicola et al., 2018).

Élimination des vaches à l'étude

Dans notre étude, le traitement avec le bG-CSF n'avait pas affecté le retrait des vaches à l'étude. En général, le nombre de vaches retirées durant les 120 premiers JEL de suivi était faible; seulement 3 sur les 60 vaches inscrites soit 5,0%. Spécifiquement, même si faible, nous avons enregistré plus de vaches éliminées dans le groupe saline 6,9% (2/29) contre 3,2% (1/31) dans le groupe bG-CSF. Le trouble locomoteur enregistré dans le groupe bG-CSF était associé aux symptômes cliniques habituels du bG-CSF définis dans la littérature.

Forces, faiblesses et perspectives de l'étude

Une des forces de notre étude a été tout d'abord son caractère novateur avec une méthodologie rigoureuse permettant d'éviter des biais de sélection et d'interprétation des résultats. Notre méthodologie a associé à la fois la période d'apparition de l'EVP et de l'EC et les propriétés pharmacodynamiques du bG-CSF. L'utilisation du bG-CSF a été confirmée pour la prévention de la mammite clinique chez les vaches laitières en

postpartum. Cependant, à l'étape de son expérimentation actuelle, l'efficacité de la molécule chez les vaches laitières en postpartum semble encore à mieux explorer. Nous avons supposé que l'administration du bG-CSF à partir du 14^e JEL permettrait de maintenir une concentration nécessaire et suffisante des PMN dans l'organisme des vaches pour faire face à l'invasion microbienne postpartum. Les expériences antérieures ont montré qu'une concentration maximale des PMN pourrait être atteinte au cours des 24h après la deuxième injection de bG-CSF avec une protection immunitaire bien élevée tout au long des deux semaines suivant le traitement (Van Schyndel et al., 2018).

Par ailleurs, partant du caractère pilote de notre essai, nous supposons que nous n'avions pas réuni préalablement toutes les conditions nécessaires permettant d'optimiser la précision de nos résultats même si l'étude a été randomisée. Notre étude a été menée au sein d'une seule ferme. Dans ce contexte, nous supposons que la validité de nos résultats pourrait être limitée à la situation interne de la seule exploitation laitière contrairement aux recommandations formulées par une étude concernant les protocoles des études cliniques multicentriques (Dechartres et al., 2011). Notre protocole était cependant comparable à celui d'une autre étude antérieure effectuée dans un seul centre et sur la même race Holstein, mais avec une évaluation de l'effet de parité (Galvao et al., 2019). Aussi, nous avons supposé que la puissance statistique de notre étude fût faible à cause de la limitation de la taille de l'échantillon étudié. En évaluant la puissance ($1-\beta$) de notre étude avec le logiciel BiostaTGV servant à la préparation des études cliniques nous constatons qu'elle était faible et était en dessous de 50% pour un niveau de confiance de 95% utilisé. Réellement, la puissance de l'estimation de la prévalence de l'endométrite était à 41% pour l'EVP, de 35% pour l'EC à estérase leucocytaire et de 8% seulement pour l'EC à PMN. Quant aux performances de reproduction subséquentes des vaches traitées avec le bG-CSF, la puissance des valeurs estimées était de 9% pour l'insémination obtenue à la première saillie et de 18% pour le succès de gestation obtenue à la PI. Des revues ont évalué l'influence de la taille de l'échantillon sur la puissance et la précision de l'estimation de l'effet du traitement (Hajian-Tilaki, 2011, Dechartres et al., 2013). Des études ont rapporté que les effets de traitement demeurent plus grands ou plus petits dans les plus petits essais

cliniques avec des rapports des cotes inférieurs à 1 même dans le cadre des études randomisées (Dechartres et al., 2011, Dechartres et al., 2013).

À cette étape, les résultats de cette étude pilote sont donc à interpréter avec prudence à cause de l'insuffisance de puissance des résultats. Par exemple, pour cette étude, 905 vaches sont nécessaires pour confirmer que le SPI (89,7%) dans le groupe saline était supérieur au SPI (87,1%) dans le groupe bG-CSF pour un niveau de confiance de 5% et une puissance estimée de 80%. Soit donc, un manque de 845 (905-60) vaches pour obtenir une différence significative dans notre étude.

Chapitre 5 – Conclusion générale

Ce projet de recherche visait à déterminer la capacité du traitement bG-CSF à prévenir l'EVP et l'EC fréquemment observés en association avec l'immunosuppression et l'infection microbienne chez les vaches laitières Holsteins en postpartum. Nos objectifs étaient d'évaluer l'effet du bG-CSF administré aux 14^e et 21^e JEL sur l'EVP et l'EC au 35^e JEL et, sur les performances de reproduction subséquentes des vaches au cours des 120 premiers JEL et enfin répertorier les incidences du bG-CSF au cours de cette période. Les vaches traitées avec le bG-CSF avaient des réponses immunitaires utérines en ScEVP, ScEL et PPMN et aussi des prévalences de l'EVP et de l'EC numériquement plus importantes. De plus, les taux d'insémination et de succès de gestation à la PI enregistrés étaient tous plus faibles au cours des 120 premiers JEL. Nous n'avons détecté cependant aucune différence statistique significative des résultats obtenus entre le groupe saline et le groupe bG-CSF. À cette étape, nous concluons que le bG-CSF n'a pas prévenu l'EVP et l'EC. D'autres essais cliniques plus importants sont nécessaires afin de pouvoir déterminer une différence ou une similarité possible entre la saline physiologique et le bG-CSF et conclure sur l'efficacité de l'administration du bG-CSF aux 14^e et 21^e JEL pour prévenir l'EVP et l'EC chez les vaches laitières Holsteins en postpartum.

Références bibliographiques

- Aghajanova, L., S. Houshdaran, S. Balayan, E. Manvelyan, J. C. Irwin, H. G. Huddleston, and L. C. Giudice. 2018. In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration. *Journal of assisted reproduction and genetics* 35(5):757-770.
- Arpinelli, F. and F. Bamfi. 2006. The FDA guidance for industry on PROs: the point of view of a pharmaceutical company. *Health and quality of life outcomes* 4(1):1-5.
- Awad, S., S. P. Allison, and D. N. Lobo. 2008. The history of 0.9% saline. *Clinical Nutrition* 27(2):179-188.
- Barlund, C., T. Carruthers, C. Waldner, and C. Palmer. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69(6):714-723.
- Bartlett, P., J. Kirk, and E. Mather. 1986. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology* 26(3):309-322.
- Benzaquen, M. E., C. Risco, L. F. Archbald, M. J. Thatcher, and W. W. Thatcher. 2004. Evaluation of rectal temperature and calving related factors on the incidence of metritis in postpartum dairy cows. Pages 197-198, 262-263. American Association of Bovine Practitioners, Stillwater.
- Bicalho, M. L. S., F. S. Lima, V. S. Machado, E. B. Meira, Jr., E. K. Ganda, C. Foditsch, R. C. Bicalho, and R. O. Gilbert. 2016. Associations among *Trueperella pyogenes*, endometritis diagnosis, and pregnancy outcomes in dairy cows. *Theriogenology* 85(2):267-274.
- Bicalho, M. L. S., V. S. Machado, G. Oikonomou, R. O. Gilbert, and R. C. Bicalho. 2012. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Veterinary Microbiology* 157(1/2):125-131.
- Bicalho, R. C., V. S. Machado, M. L. S. Bicalho, R. O. Gilbert, A. G. V. Teixeira, L. S. Caixeta, and R. V. V. Pereira. 2010. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science* 93(12):5818-5830.
- Boer, M. W. d., S. J. LeBlanc, J. Dubuc, S. Meier, W. Heuwieser, S. Arlt, R. O. Gilbert, and S. McDougall. 2014. Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97(7):3983-3999.
- Brackenbury, L., B. Carr, and B. Charleston. 2003. Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Veterinary microbiology* 96(4):337-344.
- Brick, T. A., G. M. Schuenemann, S. Bas, J. B. Daniels, C. Pinto, D. M. Rings, and P. J. Rajala-Schultz. 2012. Effect of intrauterine dextrose or antibiotic therapy on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with clinical endometritis. *Journal of dairy science* 95(4):1894-1905.

- Burg, N. D. and M. H. Pillinger. 2001. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clinical immunology* 99(1):7-17.
- Burke, C., S. Meier, S. McDougall, C. Compton, M. Mitchell, and J. Roche. 2010. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(11):5363-5373.
- Canning, P., R. Hassfurth, T. TerHune, K. Rogers, S. Abbott, and D. Kolb. 2017. Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous cows on US commercial dairies. *Journal of Dairy Science* 100(8):6504-6515.
- Carneiro, L. C., A. F. Ferreira, M. Padua, J. P. Saut, A. S. Ferraudo, and R. M. d. Santos. 2014. Incidence of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance of crossbred dairy cows. *Tropical Animal Health and Production* 46(8):1435-1439.
- Chapwanya, A., K. G. Meade, C. Foley, F. Narciandi, A. C. O. Evans, M. L. Doherty, J. J. Callanan, and C. O'Farrelly. 2012. The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. *Reproduction, Fertility and Development* 24(8):1028-1039.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvão, B. M. Crosier, and R. O. Gilbert. 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 94(2):762-770.
- Couto, G., D. Vaillancourt, and R. Lefebvre. 2013. Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 79(1):103-107.
- De Boer, M., S. LeBlanc, J. Dubuc, S. Meier, W. Heuwieser, S. Arlt, R. Gilbert, and S. McDougall. 2014. Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *Journal of Dairy science* 97(7):3983-3999.
- de Vlieger, J. S., D. J. Crommelin, K. Tyner, D. C. Drummond, W. Jiang, S. E. McNeil, S. Neervannan, R. M. Crist, and V. P. Shah. 2019. Report of the AAPS guidance forum on the FDA draft guidance for industry: "drug products, including biological products, that contain nanomaterials". Springer.
- Dechartres, A., I. Boutron, L. Trinquart, P. Charles, and P. Ravaud. 2011. Single-center trials show larger treatment effects than multicenter trials: evidence from a meta-epidemiologic study. *Annals of internal medicine* 155(1):39-51.
- Dechartres, A., L. Trinquart, I. Boutron, and P. Ravaud. 2013. Influence of trial sample size on treatment effect estimates: meta-epidemiological study. *Bmj* 346.
- Deguillaume, L., A. Geffré, L. Desquilbet, A. Dizien, S. Thoumire, C. Vornière, F. Constant, R. Fournier, and S. Chastant-Maillard. 2012. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(4):1776-1783.

- Denis-Robichaud, J. and J. Dubuc. 2014. Validation of two diagnostic methods for postpartum endometritis in dairy cows. Page 135. American Association of Bovine Practitioners, Stillwater.
- Denis-Robichaud, J. and J. Dubuc. 2015. Determination of optimal diagnostic criteria for purulent vaginal discharge and cytological endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98(10):6848-6855.
- Dibrov, P., J. Dzioba, K. K. Gosink, and C. C. Häse. 2002. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(8):2668-2670.
- Dohoo, I., S. Martin, and H. Stryhn. 2009. *Veterinary epidemiologic research*. VER. Inc., Charlottetown, PE, Canada.
- Donofrio, G., S. Herath, C. Sartori, S. Cavirani, C. F. Flammini, and I. M. Sheldon. 2007. Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction* 134(1):183-197.
- Drillich, M., U. Reichert, M. Mahlstedt, and W. Heuwieser. 2006. Comparison of two strategies for systemic antibiotic treatment of dairy cows with retained fetal membranes: preventive vs. selective treatment. *Journal of Dairy Science* 89(5):1502-1508.
- Dubuc, J. and J. Denis-Robichaud. 2017. A dairy herd-level study of postpartum diseases and their association with reproductive performance and culling. *Journal of dairy science* 100(4):3068-3078.
- Dubuc, J., T. Duffield, K. Leslie, J. Walton, and S. LeBlanc. 2010a. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of dairy science* 93(11):5225-5233.
- Dubuc, J., T. Duffield, K. Leslie, J. Walton, and S. LeBlanc. 2010b. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of dairy science* 93(12):5764-5771.
- Dubuc, J., T. Duffield, K. Leslie, J. Walton, and S. LeBlanc. 2011. Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. *Journal of dairy science* 94(3):1325-1338.
- Dubuc, J., T. Duffield, K. Leslie, J. Walton, and S. LeBlanc. 2012. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *Journal of dairy science* 95(4):1845-1854.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. I. Blanc. 2010c. Risk factors, impact, and treatment of postpartum uterine diseases in dairy cows. Page unpaginated. *World Buiatrics Association*, Santiago.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc. 2010d. Risk factors and impacts of retained placenta and metritis in dairy cows. Page 232. *American Association of Bovine Practitioners*, Stillwater.

- Esposito, G., P. C. Irons, E. C. Webb, and A. Chapwanya. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal reproduction science* 144(3-4):60-71.
- Esslemont, R. and E. Peeler. 1993. The scope for raising margins in dairy herds by improving fertility and health. *British Veterinary Journal* 149(6):537-547.
- Fair, T. 2015. The contribution of the maternal immune system to the establishment of pregnancy in cattle. *Front. Immunol.* 6:7.
- Ferguson, J. D. 1996. Diet, production and reproduction in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 59(1-3):173-184.
- Fischer, C., M. Drillich, S. Odau, W. Heuwieser, R. Einspanier, and C. Gabler. 2010. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reproduction, Fertility and Development* 22(5):818-829.
- Fourichon, C., H. Seegers, and X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 53(9):1729-1759.
- Gabler, C. 2010. Expression analysis in the female bovine reproductive tract. Page i + 829 pp. Freie Universität Berlin, Berlin.
- Gabler, C., M. Drillich, C. Fischer, C. Holder, W. Heuwieser, and R. Einspanier. 2009. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology* 71(6):993-1004.
- Galvão, K., C. Higgins, M. Zinicola, S. Jeon, H. Korzec, and R. Bicalho. 2019. Effect of pegbovigrastim administration on the microbiome found in the vagina of cows postpartum. *Journal of dairy science* 102(4):3439-3451.
- Galvão, K. N., M. Frajblat, W. R. Butler, S. B. Brittin, C. L. Guard, and R. O. Gilbert. 2010. Effect of early postpartum ovulation on fertility in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 45(5):e207-e211.
- Galvao, K. N., C. H. Higgins, M. Zinicola, S. J. Jeon, H. Korzec, and R. C. Bicalho. 2019. Effect of pegbovigrastim administration on the microbiome found in the vagina of cows postpartum. *Journal of Dairy Science* 102(4):3439-3451.
- Galvão, K. N., N. R. Santos, J. S. Galvão, and R. O. Gilbert. 2011. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 76(2):290-299.
- Gargett, C. E., R. W. Chan, and K. E. Schwab. 2008. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. *Molecular and cellular endocrinology* 288(1-2):22-29.
- Gargett, C. E., F. Lederman, B. Heryanto, L. S. Gambino, and P. A. Rogers. 2001. Focal vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Human Reproduction* 16(6):1065-1075.

- Gargett, C. E. and H. Masuda. 2010. Adult stem cells in the endometrium. *Molecular human reproduction* 16(11):818-834.
- Gayle, D., S. E. Ilyin, and C. R. Plata-Salamán. 1999. Feeding status and bacterial LPS-induced cytokine and neuropeptide gene expression in hypothalamus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277(4):R1188-R1195.
- Ghanem, M. E., E. Tezuka, B. Devkota, Y. Izaike, and T. Osawa. 2014. Persistence of uterine bacterial infection, and its associations with endometritis and ovarian function in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*.
- Gilbert, R., N. Santos, K. Galvão, S. Brittin, and H. Roman. 2007. The relationship between postpartum uterine bacterial infection (BI) and subclinical endometritis (SE). Pages 469-470 in *Proc. Journal of Dairy Science*. AMER DAIRY SCIENCE ASSOC 1111 N DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874 USA.
- Gilbert, R. O. 2016a. 20 Years of modern endometritis research - a review. *Clinical Theriogenology* 8(3):247-252.
- Gilbert, R. O. 2016b. Management of reproductive disease in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 32(2):387-410.
- Gilbert, R. O. 2016c. New frontiers in molecular endometritis research. *Clinical Theriogenology* 8(3):253-259.
- Gilbert, R. O. and N. R. Santos. 2016. Dynamics of postpartum endometrial cytology and bacteriology and their relationship to fertility in dairy cows. *Theriogenology* 85(8):1367-1374.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard, H. N. Erb, and M. Frajblat. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64(9):1879-1888.
- Giuliodori, M. J., M. Magnasco, R. P. Magnasco, I. M. Lacau-Mengido, and R. L. d. I. Sota. 2017. Purulent vaginal discharge in grazing dairy cows: risk factors, reproductive performance, and prostaglandin F₂ α treatment. *Journal of Dairy Science* 100(5):3805-3815.
- Goff, J. 2013. Metritis and immune function. Page unpaginated. The North American Veterinary Conference, Gainesville.
- Goff, J. P. 2008a. Immune suppression around the time of calving and the impact of metabolic disease. *Magyar Állatorvosok Lapja* 130(Supplement 1):39-41.
- Goff, J. P. 2008b. Transition cow immune function and interaction with metabolic diseases. Pages 45-57. Ohio State University, Ohio.
- Grasso, P. 2002. *Essentials of pathology for toxicologists*. CRC Press.
- Green, M., A. Ledgard, S. Beaumont, M. Berg, K. McNatty, A. Peterson, and P. Back. 2011. Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Journal of animal science* 89(11):3551-3560.

- Haimerl, P. 2013. Therapy of bovine endometritis with prostaglandin F2 α - an evidence based approach. Page 101 pp. Freie Universität Berlin, Berlin.
- Haimerl, P., W. Heuwieser, and S. Arlt. 2018a. Meta-analysis on therapy of bovine endometritis with prostaglandin F2 α —An update. *Journal of dairy science* 101(11):10557-10564.
- Haimerl, P., W. Heuwieser, and S. Arlt. 2018b. Meta-analysis on therapy of bovine endometritis with prostaglandin F2 α - an update. *Journal of Dairy Science* 101(11):10557-10564.
- Haimerl, P., W. Heuwieser, and S. Arlt. 2018c. Short communication: Meta-analysis on therapy of bovine endometritis with prostaglandin F2 α -An update. *J Dairy Sci* 101(11):10557-10564.
- Hajian-Tilaki, K. 2011. Sample size estimation in epidemiologic studies. *Caspian journal of internal medicine* 2(4):289.
- Hammon, D., I. Evjen, T. Dhiman, J. Goff, and J. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary immunology and immunopathology* 113(1-2):21-29.
- Harris, J. M. and R. B. Chess. 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature reviews Drug discovery* 2(3):214-221.
- Heppelmann, M., A. Brömmling, S. E. Ulbrich, M. Weinert, M. Piechotta, C. Wrenzycki, S. Merbach, H. A. Schoon, M. Hoedemaker, and H. Bollwein. 2015. Effect of suppression of postpartum ovulation on endometrial inflammation in dairy cows. *Theriogenology* 84(1):155-162.
- Herath, S., S. T. Lilly, N. R. Santos, R. O. Gilbert, L. Goetze, C. E. Bryant, J. O. White, J. Cronin, and I. M. Sheldon. 2009. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7(1):55.
- Hirotsu, T., T. Higashi, I. I. Abu Hashim, S. Misumi, K. Wada, K. Motoyama, and H. Arima. 2017. Self-assembly PEGylation retaining activity (SPRA) technology via a host–guest interaction surpassing conventional PEGylation methods of proteins. *Molecular pharmaceutics* 14(2):368-376.
- Jeon, S., A. Vieira Neto, M. Gobikrushanth, R. Daetz, R. D. Mingoti, A. C. B. Parize, S. L. d. Freitas, A. N. L. d. Costa, R. C. Bicalho, S. Lima, K. C. Jeong, and K. N. Galvão. 2015. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology* 81(18):6324-6332.
- Jeon, S. J., F. Cunha, A. Vieira-Neto, R. C. Bicalho, S. Lima, M. L. Bicalho, and K. N. Galvão. 2017. Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows. *Microbiome* 5(1):1-13.
- Jeong, J., I. Choi, S. Moon, S. Lee, H. Kang, Y. Jung, S. Park, and I. Kim. 2017. Risk factors for ketosis in dairy cows and associations with some blood metabolite concentrations. *Journal of Veterinary Clinics* 34(4):255-260.

- Kaitu'u-Lino, T. u. J., L. Ye, L. A. Salamonsen, J. E. Girling, and C. E. Gargett. 2012. Identification of label-retaining perivascular cells in a mouse model of endometrial decidualization, breakdown, and repair. *Biology of reproduction* 86(6):184, 181-188.
- Kaneene, J. B. and R. Miller. 1995. Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd- and cow-based modelling approaches. *Preventive Veterinary Medicine* 23(3-4):183-200.
- Karstrup, C. C., K. Klitgaard, T. K. Jensen, J. S. Agerholm, and H. G. Pedersen. 2017. Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology* 99:41-47.
- Kasimanickam, R., T. Duffield, R. Foster, C. Gartley, K. Leslie, J. Walton, and W. Johnson. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62(1-2):9-23.
- Kasimanickam, R., T. Duffield, R. Foster, C. Gartley, K. Leslie, J. Walton, and W. Johnson. 2005. The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology* 63(3):818-830.
- Kaufmann, T., M. Drillich, B.-A. Tenhagen, D. Forderung, and W. Heuwieser. 2009. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4 h after insemination and its effects on first service conception rate. *Theriogenology* 71(2):385-391.
- Kehrli Jr, M. E., J. S. Cullor, and S. C. Nickerson. 1991. Immunobiology of hematopoietic colony-stimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine. *J. Dairy Sci.* 74(12):4399-4412.
- Kimura, K., J. P. Goff, P. Canning, C. Wang, and J. A. Roth. 2014. Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97(8):4842-4851.
- Kimura, K., J. P. Goff, and M. E. Kehrli Jr. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *Journal of dairy science* 82(11):2385-2392.
- Kiracofe, G. H. 1980. Uterine involution: ITS role in regulating postpartum intervals. *J. Anim. Sci.* 51(suppl_II):16-28.
- Klebanoff, S. J., A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn, and W. M. Nauseef. 2013. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of leukocyte biology* 93(2):185-198.
- Knudsen, L. R. V., C. C. Karstrup, H. G. Pedersen, J. S. Agerholm, T. K. Jensen, and K. Klitgaard. 2015. Revisiting bovine pyometra - new insights into the disease using a culture-independent deep sequencing approach. *Veterinary Microbiology* 175(2/4):319-324.
- Langer, H. F., K. Stellos, C. Steingen, A. Frohofer, T. Schönberger, B. Krämer, B. Bigalke, A. E. May, P. Seizer, and I. Müller. 2009. Platelet derived bFGF mediates

- vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology* 47(2):315-325.
- Lanza, F. 1998. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *Journal of molecular medicine* 76(10):676-681.
- LeBlanc, S. 2003. Field study of the diagnosis and treatment of clinical endometritis in dairy cattle. *Cattle Pract.* 11:255-261.
- LeBlanc, S., T. Duffield, K. Leslie, K. Bateman, G. P. Keefe, J. Walton, and W. Johnson. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of dairy science* 85(9):2223-2236.
- LeBlanc, S. J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *The Veterinary Journal* 176(1):102-114.
- LeBlanc, S. J., T. Osawa, and J. Dubuc. 2011. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 76(9):1610-1618.
- Ledgard, A. M., G. A. Smolenski, H. Henderson, and R. S. F. Lee. 2015. Influence of pathogenic bacteria species present in the postpartum bovine uterus on proteome profiles. *Reproduction, Fertility and Development* 27(2):395-406.
- Leslie, K. 1983. The events of normal and abnormal postpartum reproductive endocrinology and uterine involution in dairy cows: a review. *The Canadian Veterinary Journal* 24(3):67.
- Leutert, C., X. v. Krueger, J. Plöntzke, and W. Heuwieser. 2012. Evaluation of vaginoscopy for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(1):206-212.
- Li, H., S.-r. Sun, J. Q. Yap, J.-h. Chen, and Q. Qian. 2016. 0.9% saline is neither normal nor physiological. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 17(3):181-187.
- Liew, P. X. and P. Kubes. 2019. The neutrophil's role during health and disease. *Physiological reviews* 99(2):1223-1248.
- Lind, M., A. S. Sipka, H. J. Schuberth, A. Blutke, R. Wanke, C. Sauter-Louis, K. A. Duda, O. Holst, P. Rainard, P. Germon, H. Zerbe, and W. Petzl. 2015. Location-specific expression of chemokines, TNF-alpha and S100 proteins in a teat explant model. *Innate Immun* 21(3):322-331.
- Luo, C., J. Li, J. Wang, J. Zheng, L. Hua, Z. Hu, D. Wang, Y. Luo, H. Kou, and R. Wang. 2010. Reduction of the incidence of retained placenta in cows treated with a new Chinese herbal medicine Dang Hong Fu used as aqua-acupuncture at GV-1. *American Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine* 5(1):29-36.
- Machado, V., G. Oikonomou, M. Bicalho, W. Knauer, R. Gilbert, and R. Bicalho. 2012. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Veterinary microbiology* 159(3-4):460-469.

- Madoz, L. V., M. J. Giuliadori, A. L. Migliorisi, M. Jaureguiberry, and R. L. d. I. Sota. 2014. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97(1):195-201.
- Magharla, D. D. 2017. Clinical implications of molecular PEGylation on therapeutic proteins. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* 8(2).
- Maquivar, M., A. Barragan, J. Velez, H. Bothe, and G. M. Schuenemann. 2015. Effect of intrauterine dextrose on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with purulent vaginal discharge under certified organic management. *J. Dairy Sci.* 98(6):3876-3886.
- Mateus, L., L. L. d. Costa, F. Bernardo, and J. R. Silva. 2002. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 37(1):31-35.
- McDougall, S., M. d. Boer, C. Compton, and S. J. LeBlanc. 2013. Clinical trial of treatment programs for purulent vaginal discharge in lactating dairy cattle in New Zealand. *Theriogenology* 79(8):1139-1145.
- McDougall, S., S. LeBlanc, and A. Heiser. 2017. Effect of prepartum energy balance on neutrophil function following pegbovigrastim treatment in periparturient cows. *Journal of dairy science* 100(9):7478-7492.
- McDougall, S., R. Macaulay, and C. Compton. 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Animal reproduction science* 99(1-2):9-23.
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164):819-826.
- Meinert, C. L. 2012. *ClinicalTrials: design, conduct and analysis*. Vol. 39. OUP USA.
- Melcher, Y., I. Prunner, and M. Drillich. 2014. Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology* 82(1):57-63.
- Miller, A. N. A., E. J. Williams, K. Sibley, S. Herath, E. A. Lane, J. Fishwick, D. M. Nash, A. N. Rycroft, H. Dobson, C. E. Bryant, and I. M. Sheldon. 2007. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology* 68(7):972-980.
- Molina-Coto, R. and M. C. Lucy. 2018. Uterine inflammation affects the reproductive performance of dairy cows: a review. *Agronomía Mesoamericana* 29(2):449-468.
- Moore, S., A. Ericsson, S. Poock, P. Melendez, and M. Lucy. 2017. Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *Journal of dairy science* 100(6):4953-4960.
- Morrow, D. 1966. Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 149:1596-1609.

- Nikolin, V. M., G. Donofrio, B. Milošević, S. Taddei, V. Radosavljević, and V. Milicević. 2007. First Serbian isolates of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis. *New Microbiologica* 30(1):53-57.
- Pascottini, O. B., M. Hostens, P. Dini, M. v. Eetvelde, P. Vercauteren, and G. Opsomer. 2016. Prevalence of cytological endometritis and effect on pregnancy outcomes at the time of insemination in nulliparous dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 99(11):9051-9056.
- Pascottini, O. B. and G. Opsomer. 2016. Postpartum uterine diseases in dairy cows: a review with emphasis on subclinical endometritis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 85(6):378-385.
- Pécsi, A., J. Földi, J. Szabó, P. Nagy, M. Kulcsár, and G. Huszenicza. 2007. Efficacy of different antimicrobial therapeutic protocols for the treatment of puerperal metritis and endometritis in dairy cows. *Magyar Állatorvosok Lapja* 129(10):590-599.
- Pleticha, S., M. Drillich, and W. Heuwieser. 2009. Evaluation of the Metricheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *Journal of dairy science* 92(11):5429-5435.
- Plöntzke, J., L. V. Madoz, R. L. d. l. Sota, W. Heuwieser, and M. Drillich. 2011. Prevalence of clinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Reproduction in Domestic Animals* 46(3):520-526.
- Pothmann, H., I. Prunner, K. Wagener, M. Jaureguiberry, R. L. d. l. Sota, R. Erber, C. Aurich, M. Ehling-Schulz, and M. Drillich. 2015. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology* 83(8):1249-1253.
- Potter, T. J., J. Guitian, J. Fishwick, P. J. Gordon, and I. M. Sheldon. 2010. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 74(1):127-134.
- Prunner, I., K. Wagener, H. Pothmann, M. Ehling-Schulz, and M. Drillich. 2014. Risk factors for uterine diseases on small-and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology* 82(6):857-865.
- Rhodes, L. 2018. Changing innovation into a registered product: From concept to regulatory approval. *Theriogenology* 112:75-81.
- Ribeiro, E. S., F. S. Lima, L. F. Greco, R. S. Bisinotto, A. P. A. Monteiro, M. Favoreto, H. Ayres, R. S. Marsola, N. Martinez, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *Journal of Dairy Science* 96(9):5682-5697.
- Roche, J., C. Burke, M. Crookenden, A. Heiser, J. Looor, S. Meier, M. Mitchell, C. Phyn, and S.-A. Turner. 2018. Fertility and the transition dairy cow. *Reproduction, Fertility and Development* 30(1):85-100.
- Roche, J., D. Mackey, and M. Diskin. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Animal reproduction science* 60:703-712.

- Ruiz, R., L. Tedeschi, and A. Sepúlveda. 2017a. Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds. *Journal of dairy science* 100(4):3305-3317.
- Ruiz, R., L. O. Tedeschi, and A. Sepulveda. 2017b. Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds. *Journal of Dairy Science* 100(4):3305-3317.
- Runciman, D., G. Anderson, and J. Malmo. 2009. Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance. *Australian Veterinary Journal* 87(9):369-378.
- Runciman, D., G. Anderson, J. Malmo, and G. Davis. 2008. Use of postpartum vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Australian Veterinary Journal* 86(6):205-213.
- Salasel, B., A. Mokhtari, and T. Taktaz. 2010. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology* 74(7):1271-1278.
- Salehi, R., M. G. Colazo, M. Gobikrushanth, U. Basu, and D. J. Ambrose. 2017. Effects of prepartum oilseed supplements on subclinical endometritis, pro-and anti-inflammatory cytokine transcripts in endometrial cells and postpartum ovarian function in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development* 29(4):747-758.
- Santos, T. M. A., R. O. Gilbert, and R. C. Bicalho. 2011. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94(1):291-302.
- Sanz, A., A. Bernués, D. Villalba, I. Casasús, and R. Revilla. 2004. Influence of management and nutrition on postpartum interval in Brown Swiss and Pirenaica cows. *Livestock Production Science* 86(1-3):179-191.
- Schierwagen, C., A.-C. Bylund-Fellenius, and C. Lundberg. 1990. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *Journal of pharmacological methods* 23(3):179-186.
- Schuenemann, G. M., T. A. Brick, and S. Bas. 2011. Effective treatment of uterine disease in certified organic dairy herds. *Clinical Theriogenology* 3(4):555-558.
- Schyndel, S. J. v., J. Carrier, O. B. Pascottini, and S. J. Leblanc. 2018. The effect of pegbovigrastim on circulating neutrophil count in dairy cattle: a randomized controlled trial. *PLoS ONE* 13(6):e0198701.
- Sheldon, I., S. Price, J. Cronin, R. Gilbert, and J. Gadsby. 2009a. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reproduction in domestic animals* 44:1-9.
- Sheldon, I. M. 2004. The postpartum uterus. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 20(3):569-591.

- Sheldon, I. M., J. Cronin, and A. Borges. 2011a. The postpartum period and dairy cow fertility. Part 2: Ovarian function. *UK Vet: Livestock* 16(5):20...24.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, and A. Borges. 2011b. The postpartum period and modern dairy cow fertility Part 1: Uterine function. *UK Vet: Livestock* 16(4):14-18.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio, and H.-J. Schuberth. 2009b. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of reproduction* 81(6):1025-1032.
- Sheldon, I. M., J. G. Cronin, and J. J. Bromfield. 2019. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annual review of animal biosciences* 7:361-384.
- Sheldon, I. M. and H. Dobson. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Animal reproduction science* 82:295-306.
- Sheldon, I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc, and R. O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65(8):1516-1530.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft, and H. Dobson. 2002. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Veterinary Record* 151(18):531-534.
- Sheldon, I. M. and S. E. Owens. 2017. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *Animal Reproduction (Belo Horizonte)* 14(3):622-629.
- Sheldon, I. M., J. C. Price, and J. J. Bromfield. 2014. Infections distant from the ovary impact ovarian function mediated by innate immune mechanisms. *Cattle Practice* 22(1):61-64.
- Sheldon, I. M., A. N. Rycroft, B. Dogan, M. Craven, J. J. Bromfield, A. Chandler, M. H. Roberts, S. B. Price, R. O. Gilbert, and K. W. Simpson. 2010. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *Plos one* 5(2):e9192.
- Sheldon, I. M., A. N. Rycroft, and C. Zhou. 2004. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Veterinary Record* 154(10):289-293.
- Sheldon, I. M., E. J. Williams, A. N. A. Miller, D. M. Nash, and S. Herath. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Veterinary Journal* 176(1):115-121.
- Sheldon, M. 2006. A healthy uterus means a wealthy farm. *International Dairy Topics* 5(5):22-23.
- Short, R. E., R. A. Bellows, R. B. Staigmiller, J. G. Berardinelli, and E. E. Custer. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68(3):799-816.
- Singh, M., A. Sharma, A. Sharma, and P. Kumar. 2017. Repeat breeding and its treatment in dairy cattle of Himachal Pradesh (India) - a review. *Indian Journal of Animal Reproduction* 38(2):1-5.

- Stellos, K., P. Seizer, B. Bigalke, K. Daub, T. Geisler, and M. Gawaz. 2010. Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro. Pages 139-145 in Proc. Seminars in thrombosis and hemostasis. © Thieme Medical Publishers.
- Stevenson, J. S. and E. P. Call. 1988. Fertility of postpartum dairy cows after administration of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 α : A field trial. *Journal of Dairy Science* 71(7):1926-1933.
- Toni, F., L. Vincenti, A. Ricci, and Y. Schukken. 2015. Postpartum uterine diseases and their impacts on conception and days open in dairy herds in Italy. *Theriogenology* 84(7):1206-1214.
- Tsousis, G., R. Sharifi, and M. Hoedemaker. 2009. Associations between the clinical signs of chronic endometritis with ovarian cysts and body condition loss in German Holstein Friesian cows. *J. Vet. Sci.* 10(4):337-341.
- Turner, M., G. Healey, and I. Sheldon. 2012. Immunity and inflammation in the uterus. *Reproduction in Domestic Animals* 47:402-409.
- Van Schyndel, S. J., J. Carrier, O. B. Pascottini, and S. J. LeBlanc. 2018. The effect of pegbovigrastim on circulating neutrophil count in dairy cattle: A randomized controlled trial. *Plos One* 13(6):8.
- Velladurai, C., M. Selvaraju, and R. E. Napoleon. 2016. Postparturient total uterine prolapse and its management in a goat. *Indian Veterinary Journal* 93(11):60-61.
- Wagener, K., C. Gabler, and M. Drillich. 2017. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 94:21-30.
- Wagener, K., T. Grunert, I. Prunner, M. Ehling-Schulz, and M. Drillich. 2014. Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis. *The Veterinary Journal* 202(3):527-532.
- Wang, D., A. Bakhai, and N. Maffulli. 2003. A primer for statistical analysis of clinical trials. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 19(8):874-881.
- Westermann, S., M. Drillich, T. Kaufmann, L. Madoz, and W. Heuwieser. 2010. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology* 74(7):1248-1255.
- Wettemann, R. P. 1980. Postpartum endocrine function of cattle, sheep and swine. *J. Anim. Sci.* 51(suppl_II):2-15.
- Williams, E. J., D. P. Fischer, D. U. Pfeiffer, G. C. W. England, D. E. Noakes, H. Dobson, and I. M. Sheldon. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63(1):102-117.

- Williams, E. J., S. Herath, G. C. W. England, H. Dobson, C. E. Bryant, and I. M. Sheldon. 2008. Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. *Animal* 2(8):1153-1157.
- Winterbourn, C. C., M. C. Vissers, and A. J. Kettle. 2000. Myeloperoxidase. *Current opinion in hematology* 7(1):53-58.
- Yavari, M., M. Haghkhah, M. R. Ahmadi, H. R. Gheisari, and S. Nazifi. 2009. Comparison of cervical and uterine cytology between different classification of postpartum endometritis and bacterial isolates in Holstein dairy cows. *International Journal of Dairy Science* 4(1):19-26.
- Youngquist, R. and M. D. Shore. 1997. Postpartum uterine infections. Pages 335-340. WB Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Zhang, Z., Y. Zhang, S. Song, L. Yin, D. Sun, and J. Gu. 2020. Recent advances in the bioanalytical methods of polyethylene glycols and PEGylated pharmaceuticals. *Journal of separation science* 43(9-10):1978-1997.
- Zinicola, M., H. Korzec, A. Teixeira, E. Ganda, L. Bringhamti, A. Tomazi, R. Gilbert, and R. Bicalho. 2018. Effects of pegbovigrastim administration on periparturient diseases, milk production, and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of dairy science* 101(12):11199-11217.