

II. Résultats

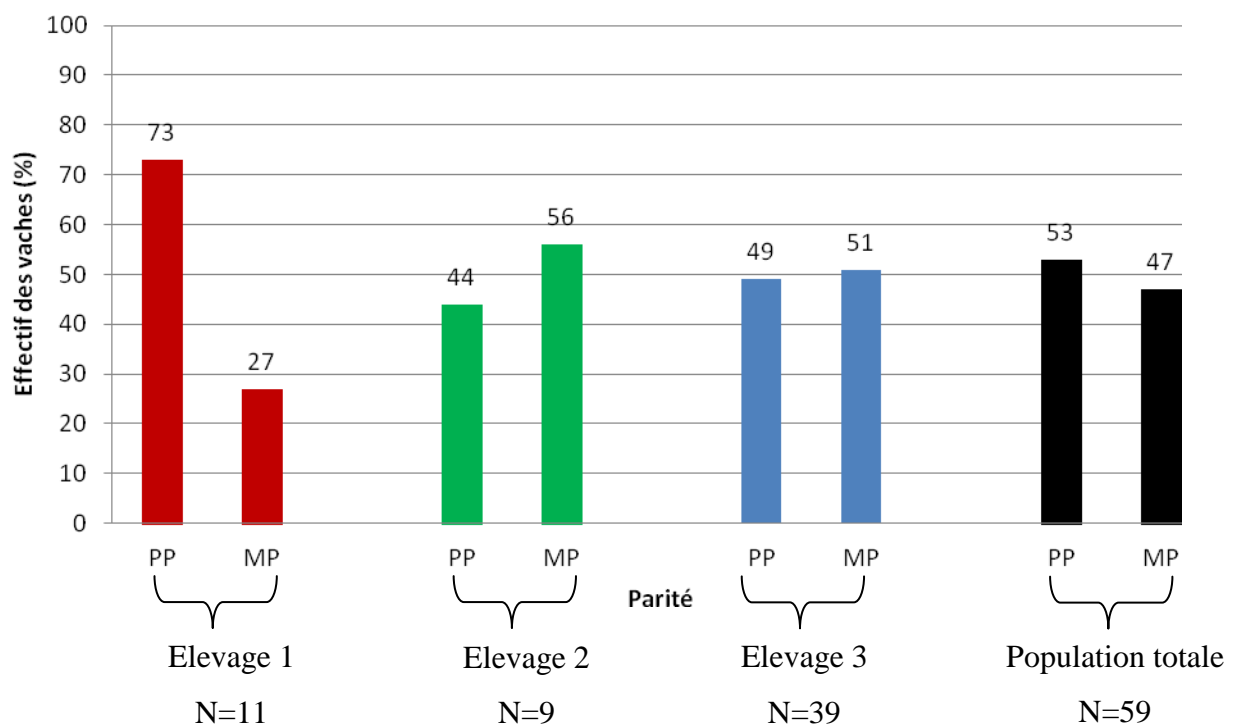
1. Description de l'échantillon

Ce protocole a réuni 59 vaches, provenant de trois élevages différents : 11 viennent du premier élevage, 9 du deuxième et 39 du troisième. Les prélèvements ont été réalisés sur deux périodes consécutives : 30 vaches ont été recrutées au cours de la première période et 29 lors de la seconde.

1.1. Parité

L'échantillon est composé de 53% (31/59) de primipares et de 47% (28/59) de multipares. Cette répartition (figure 13) se retrouve à peu près dans les élevages 2 et 3, mais dans l'élevage 1, la proportion de primipares est beaucoup plus élevée, soit 73% (8/11)

Figure 13 : Pourcentage de vaches primipares (PP) et multipares (MP) dans chaque élevage (59 vaches au total)



1.2. Etat corporel

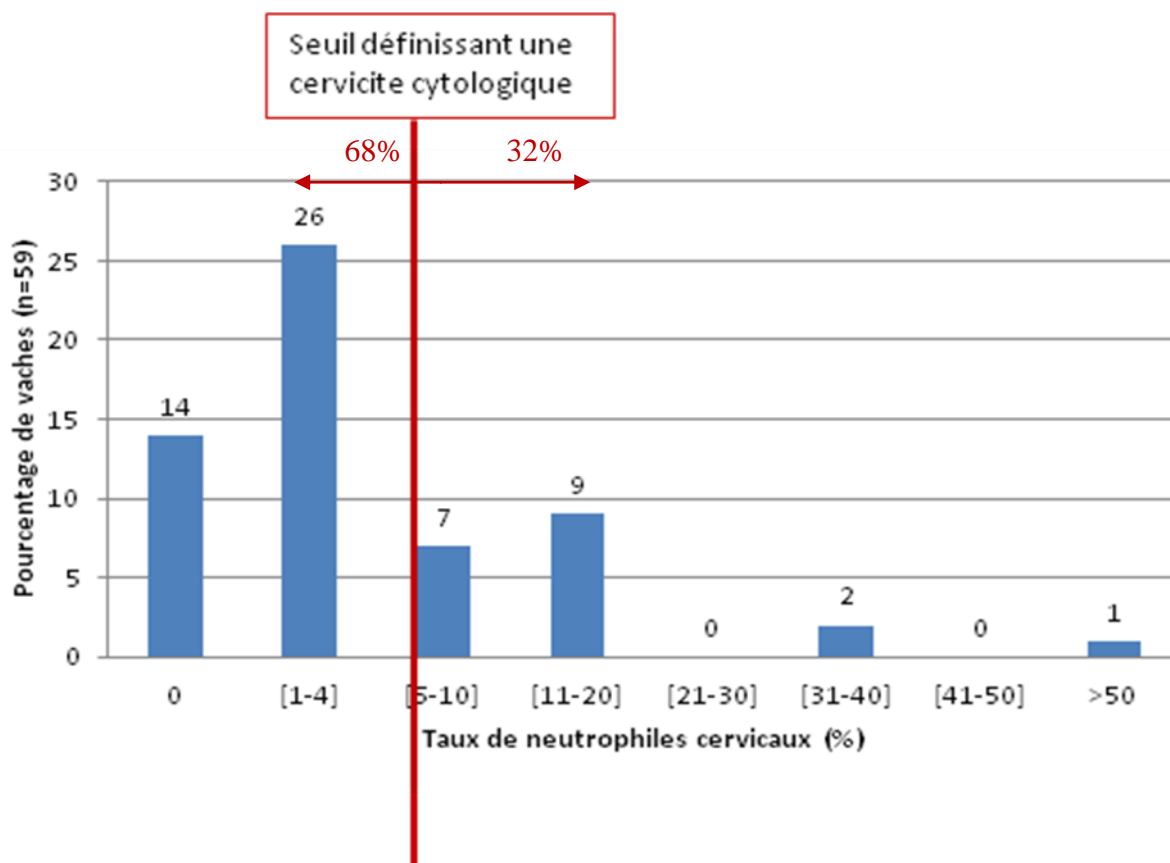
La note d'état corporel moyenne des 59 vaches recrutées est $2,4 \pm 0,7$, soit $2,3 \pm 0,7$ dans le premier et le deuxième élevage, $2,5 \pm 0,6$ dans le troisième.

1.3. Prévalence de la cervicite cytologique

La technique de référence de diagnostic des cervicites subcliniques utilisée est la cytologie cervicale par prélèvement à l'aide d'une cytobrosse, avec un seuil de positivité à 5% de cellules granulocytes neutrophiles parmi 200 cellules comptées sur un frottis (Deguillaume *et al.*, 2012).

Par cette technique, la fréquence des vaches atteintes de cervicite subclinique lors du recrutement entre 28 et 35 jours post-partum est de 32%, soit 19 vaches sur 59. La distribution du taux de neutrophiles cervical est donnée par la figure 14.

Figure 14 : Distribution des vaches en fonction du taux de neutrophiles cervicaux (n=59)



Parmi les 59 vaches de l'échantillon, 34 ont été traitées à J0 et 25 n'ont pas été traitées.

Les résultats sont basés sur la comparaison des deux lots de vaches, « traité » et « non traité ». Pour que celle-ci soit statistiquement interprétable, il est indispensable de vérifier la comparabilité des lots traité et non traité lors du premier prélèvement (tableau 2).

Tableau 2 : Comparabilité des lots expérimentaux à J0

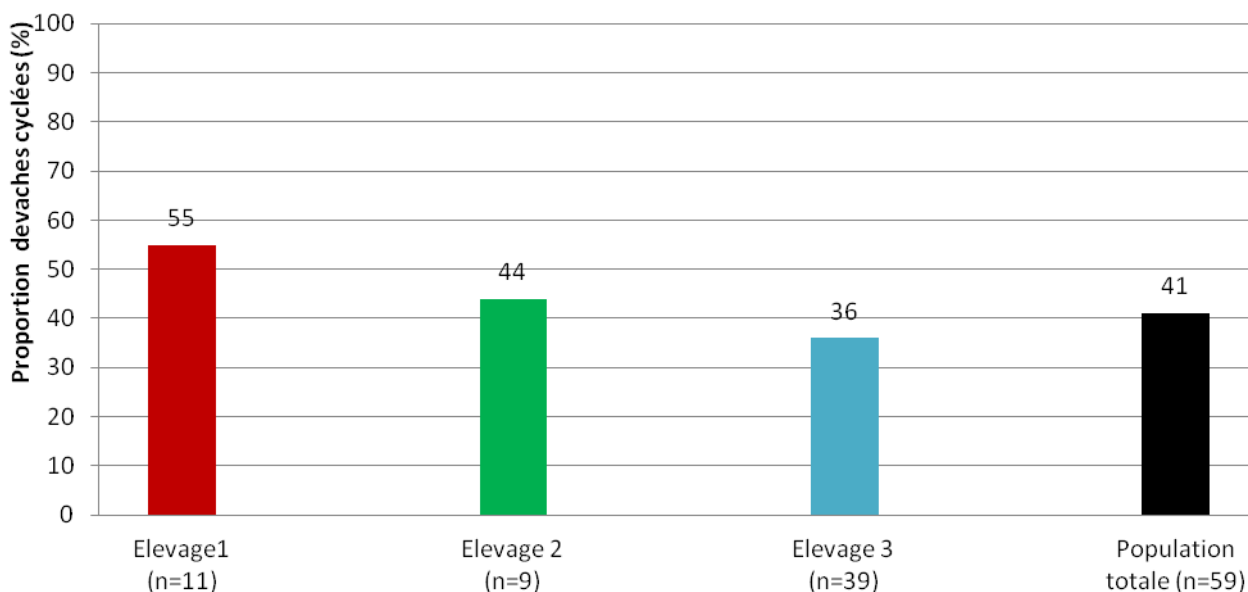
Traitement	Médiane inflammation col (%)	25 ^e percentile (%)	75 ^e percentile (%)
Oui	2,5	1	7
Non	1	1	8

Les médianes d'inflammation cervicale à J0 des lots de vaches traitées et non traitées ne sont pas significativement différentes à J0 ($p=0,762$). Donc ces lots sont comparables sur le niveau initial d'inflammation et utilisables pour l'étude statistique ultérieure.

1.4. Taux de progestérone

Les valeurs des taux sanguins de progestérone à J0 sont très étendues, de 0,03 nmol/L au minimum à 20,01 nmol/L au maximum, avec une moyenne de $2,64 \pm 3,7$ nmol/L. Parmi les 59 vaches de l'échantillon, 41% (24) ont une valeur de progestéronémie supérieure ou égale à 3,2 nmol/L et sont donc considérées cyclées. Ce pourcentage est de 55%, 44% et 36% pour respectivement l'élevage 1, l'élevage 2 et l'élevage 3 (figure 15).

Figure 15 : Pourcentage de vaches cyclées ($P4 > 3,2$ nmol/L) à J0

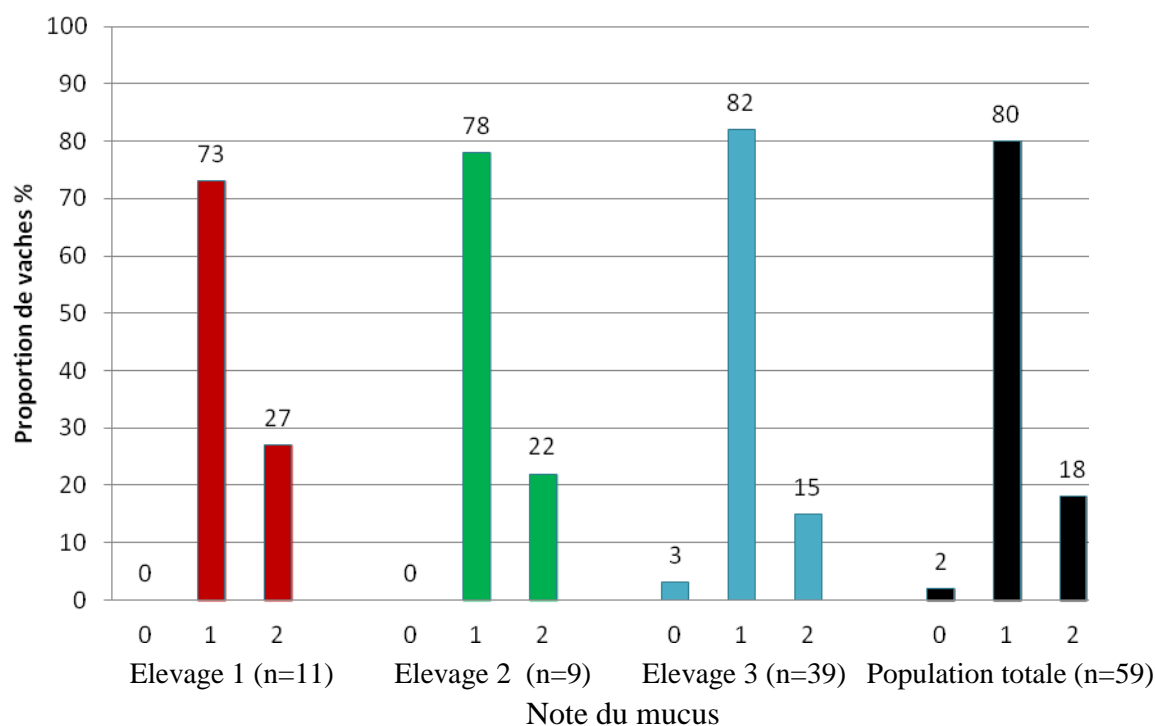


1.5. Qualité du mucus

Parmi les 59 vaches, 80% (47/59) ont un mucus vaginal clair et translucide (note 1), 18% (11/59) ont quelques flocons dans leur mucus vaginal (note 2) et pour 2% (1/59) des vaches la palpation vaginale n'a permis de récolter aucune trace de mucus (note 0).

Cette répartition est à peu près respectée dans les trois élevages (figure 16).

Figure 16 : Distribution des vaches dans chaque élevage, en fonction de la classification de leur mucus cervical



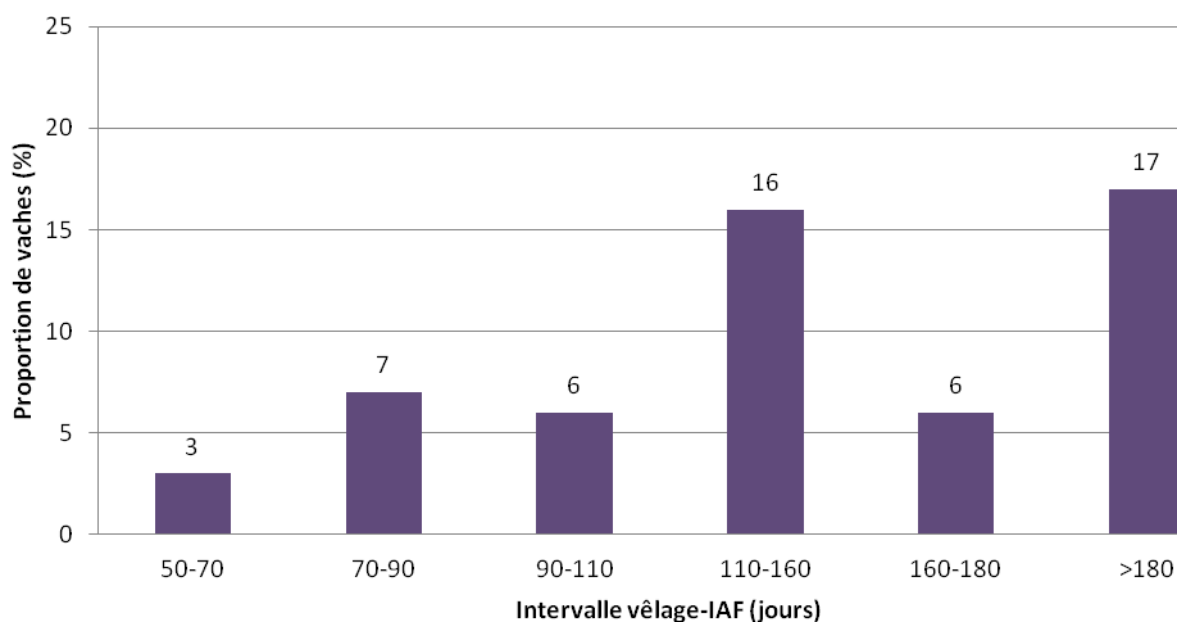
1.6. Performances de reproduction

Les données de reproduction ne sont pas connues pour toutes les vaches. Les causes de non recueil des informations sont diverses : réforme avant la mise à la reproduction (n=3), anœstrus très long qui a dépassé la date limite de recueil des données, soit décembre 2010 (n=2), pas d'insémination fécondante à la date limite (n=4) ou encore perte des données par l'éleveur (n=1).

Dans l'échantillon d'étude, aucune vache n'a été mise à la reproduction avant 50 jpp. Pour 57% d'entre elles (34/59) le délai entre le vêlage et l'insémination fécondante a été de plus de 110 jours, et de plus de 180 jours pour 29% (17/59). Il y a donc 4 vaches, soit 7% de l'échantillon, pour lesquelles ce délai n'est pas connu (figure 17).

Parmi les 49 vaches dont la date de l'insémination fécondante est connue, le seuil de 3 IA ou plus a été franchi par 24% des vaches (12/49). Le nombre d'IA moyen par vache est assez proche dans les trois élevages, respectivement de 2,3, 2,9 et 2,1, pour une moyenne sur l'ensemble de l'échantillon de $2,2 \pm 1,5$ IA par vache.

Figure 17 : Distribution des vaches en fonction de leur intervalle vèlage-insémination fécondante (IAF) en jours (n=59)



L'ensemble des données descriptives de l'échantillon d'étude est récapitulé dans le tableau 3.

Tableau 3 : Synthèse des caractéristiques descriptives de l'échantillon

NEC=Note d'État Corporel, IA=Insémination Artificielle, IV-IAF=Intervalle Vêlage-Insémination Artificielle Fécondante, IA1=première Insémination Artificielle, P4=Progestéronémie

Effectif		Elevage 1 % (n)	Elevage 2 % (n)	Elevage 3 % (n)	Total % (n)
Lactation	Primipare	14 (8)	7 (4)	32 (19)	53 (31)
	Multipare	5 (3)	8 (5)	34 (20)	47 (28)
NEC	≥ 2,5	8 (5)	7 (4)	38 (22)	53 (31)
	< 2,5	10 (6)	8 (5)	29 (17)	47 (28)
Traitement	Céfapirine voie intrautérine	10 (6)	10 (6)	36 (21)	56 (33)
	Aucun	8 (5)	5 (3)	31 (18)	44 (26)
Inflammation col J0	≥ 5%	12 (7)	2 (1)	18 (11)	32 (19)
	< 5%	7 (4)	14 (8)	47 (28)	68 (40)
Nombre d'IA	≥ 3 IA	3 (2)	7 (4)	16 (9)	26 (15)
	< 3 IA	14 (8)	5 (3)	47 (28)	66 (39)
	non communiqué	2 (1)	3 (2)	3 (2)	8 (5)
IV-IAF	<50j	0	0	0	0
	50-110j	0	5 (3)	21 (13)	26 (15)
	>110j	14 (8)	7 (4)	37 (22)	57 (34)
	non communiqué	5 (3)	5 (3)	7 (4)	17 (10)
IV-IA1 moyen (j)		186	76	105	118
Nombre total moyen d'IA/vache		2,3	2,9	2,1	2,2
Cyclicité à J0	P4 ≥ 3,2 nmol/L	10 (6)	7 (4)	24 (14)	41 (24)
	P4 < 3,2 nmol/L	8 (5)	8 (5)	43 (25)	59 (35)

2. Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des résultats obtenus a été focalisée sur les effets obtenus par un traitement intra-utérin à la céfapirine sur l'inflammation du col de l'utérus.

Nous avons tout d'abord étudié le bénéfice potentiel de ce traitement sur des vaches atteintes de cervicite subclinique (au seuil de 5% de GNN à la cytologie), puis nous avons voulu évaluer l'innocuité à court terme d'un tel traitement.

2.1. Effet bénéfique du traitement à la céfapirine

L'étude du bénéfice a été effectuée en deux temps. Nous avons tout d'abord ciblé les vaches atteintes de cervicite en comparant les médianes d'inflammation cervicale, entre J0 et J14, chez les vaches atteintes de cervicite subclinique et ayant reçu de la céfapirine, puis nous nous sommes intéressés à l'ensemble de notre échantillon, en comparant les médianes d'inflammation cervicale à J14, entre le lot traité à la céfapirine et le lot non traité, sans connaître leur statut inflammatoire cervical initial.

Pour réaliser ces analyses, il a fallu vérifier que les lots traités / non traités étaient comparables, dans la population d'étude générale et dans la population atteinte de cervicite subclinique à J0. Le tableau 4 présente les médianes d'inflammation à J0 chez les vaches malades, traitées et non traitées. L'absence de différence significative est confirmée par le test de Wilcoxon ($p=0,461$).

Tableau 4 : Comparabilité des lots (traités et non traités à J0), chez les vaches atteintes de cervicite subclinique à J0

Traitement	Médiane taux de neutrophiles cervical (%)	25 ^e percentile (%)	75 ^e percentile (%)
Oui	14	9	35
Non	12	8	16

Le tableau 5 regroupe les médianes et les percentiles du taux de neutrophiles cervical des vaches traitées et non traitées, pour toute la population d'étude. L'absence de différence significative dans la population d'étude est confirmée par le test de Wilcoxon ($p=0,762$).

Tableau 5 : Comparabilité des lots traités et non traités à J0, dans la population d'étude

Traitement	Médiane taux de neutrophiles cervical (%)	25 ^e percentile (%)	75 ^e percentile (%)
Oui	2,5	1	7
Non	1	1	8

Ainsi, les lots de vaches traitées et non traitées sont comparables à J0, dans la population d'étude et parmi les vaches atteintes de cervicite subclinique.

2.1.1. Comparaison de l'inflammation cervicale entre J0 et J14 chez les vaches atteintes de cervicite subclinique à J0

Parmi les vaches atteintes de cervicite subclinique à J0 et ayant reçu le traitement à la céfapirine, soit 9 vaches, la médiane du pourcentage de neutrophiles cervical à J0 est 14% ±17, tandis qu'à J14 elle est de 5% ± 9. Ces données sont regroupées dans le tableau 6. La médiane du pourcentage de neutrophiles cervical à J14 chez les vaches atteintes de cervicite subclinique à J0 et traitées par voie intra-utérine à la céfapirine est significativement inférieure qu'à J0, d'après le test de Wilcoxon (p=0,047).

Tableau 6 : Comparaison de l'intensité de l'inflammation cervicale, à J0 et J14, chez les vaches atteintes de cervicite subclinique à J0 et traitées à la céfapirine (n=9)

Prélèvement	Médiane taux de neutrophiles cervical (%)	25^e percentile (%)	75^e percentile (%)
J0	14	9	35
J14	5	1	10

Pour pouvoir interpréter l'efficacité du traitement à la céfapirine, il faut se demander si ces résultats se retrouvent parmi les médianes d'inflammation des vaches n'ayant pas reçu de traitement, ce qui est présenté dans le tableau 7. Il n'y a pas de différence significative (p=0,27) entre les médianes d'inflammation cervicale entre J0 et J14, chez les vaches atteintes de cervicite subclinique à J0 et n'ayant pas reçu de traitement (n=10). L'évolution des vaches avec une inflammation cervicale supérieure à 5% à J0 est synthétisée dans la figure 18.

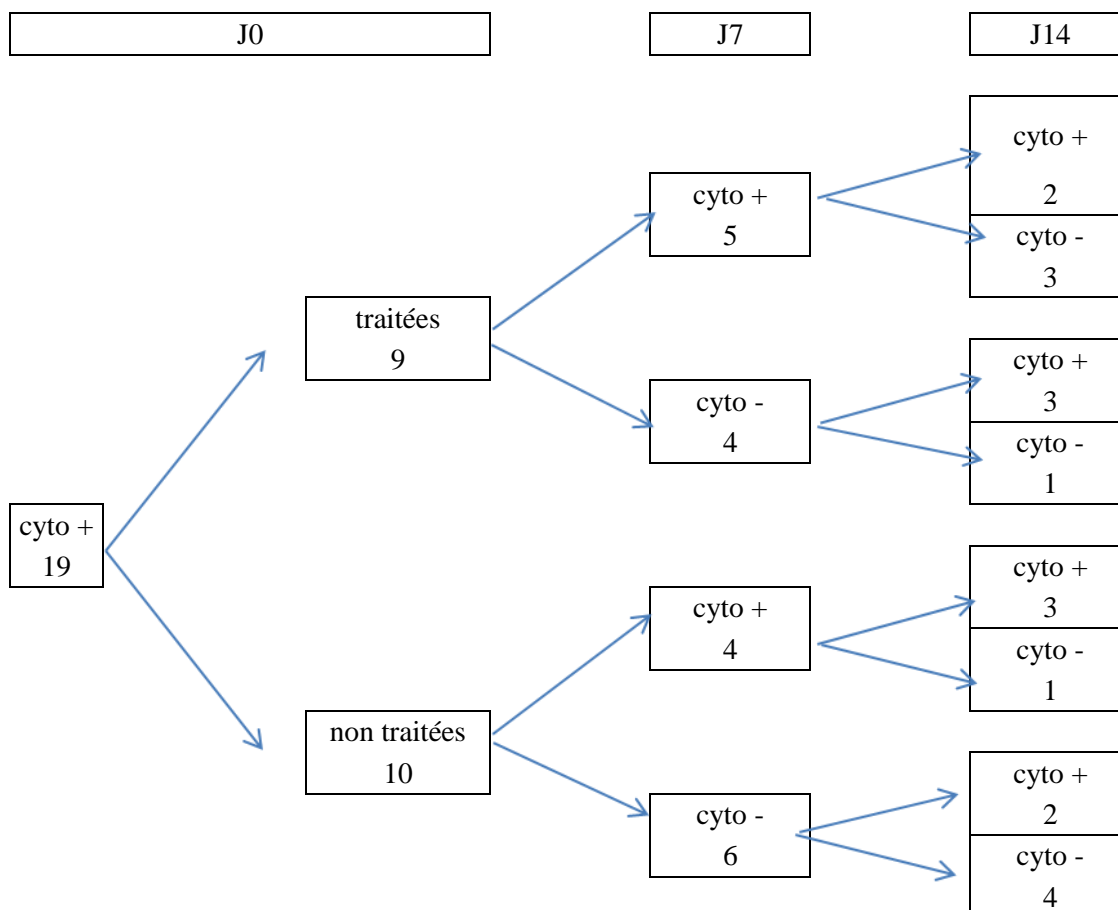
Tableau 7 : Comparaison de l'intensité de l'inflammation cervicale, à J0 et J14, chez les vaches atteintes de cervicite subclinique à J0 et non traitées à la céfapirine (n=10)

Prélèvement	Médiane taux de neutrophiles cervical (%)	25^e percentile (%)	75^e percentile (%)
J0	12	8	16
J14	9	1	20

Figure 18 : Synthèse de l'évolution des vaches atteintes de cervicite cytologique à J0

Cyto + : Pourcentage cervical de GNN $\geq 5\%$

Cyto - : Pourcentage cervical de GNN $< 5\%$



2.1.2. Comparaison de l'inflammation cervicale entre J0 et J14 chez toutes les vaches traitées

Nous avons ensuite voulu examiner s'il existe une amélioration significative de l'intensité de l'inflammation cervicale du troupeau lorsque l'on traite systématiquement tout le troupeau, entre 28 et 35 jpp.

La comparaison des médianes d'inflammation cervicale des lots traité à J0 (n=34) et non traité à J0 (n=25), présentée dans le tableau 8, n'a pas montré de différence significative, d'après le test de Wilcoxon (p=0,197).

Tableau 8 : Comparaison de l'intensité de l'inflammation cervicale à J14, chez les vaches traitées à la céfapirine à J0 (n=33) et non traitées (n=26)

Traitement	Médiane taux de neutrophiles cervical (%)	25 ^e percentile (%)	75 ^e percentile (%)
Oui	3	0	10
Non	5	1,5	15

2.2. Innocuité du traitement à la céfapirine

Pour tester l'innocuité à court terme du traitement intra-utérin à la céfapirine sur l'inflammation cervicale, nous avons comparé les médianes des taux de neutrophiles cervicaux entre J0 et J7, ainsi qu'entre J0 et J14, chez les vaches saines à J0. Cette comparaison est donnée dans les tableaux 9 et 10, auxquels nous avons appliqué le test de Wilcoxon.

Le test de Wilcoxon montre qu'il n'y a pas de différence significative entre l'inflammation cervicale à J0 et J7 ($p=0,41$), ni entre J0 et J14 ($p=0,22$) chez les vaches saines ayant reçu de la céfapirine. L'évolution des vaches sans inflammation cervicale est synthétisée dans la figure 19.

Tableau 9 : Comparaison de l'intensité de l'inflammation cervicale à J0 et J7, chez les vaches saines à J0 et traitées à la céfapirine (n=24)

Prélèvement	Médiane taux de neutrophiles cervical (%)	25 ^e percentile (%)	75 ^e percentile (%)
J0	1	0	1
J7	1	0	3,5

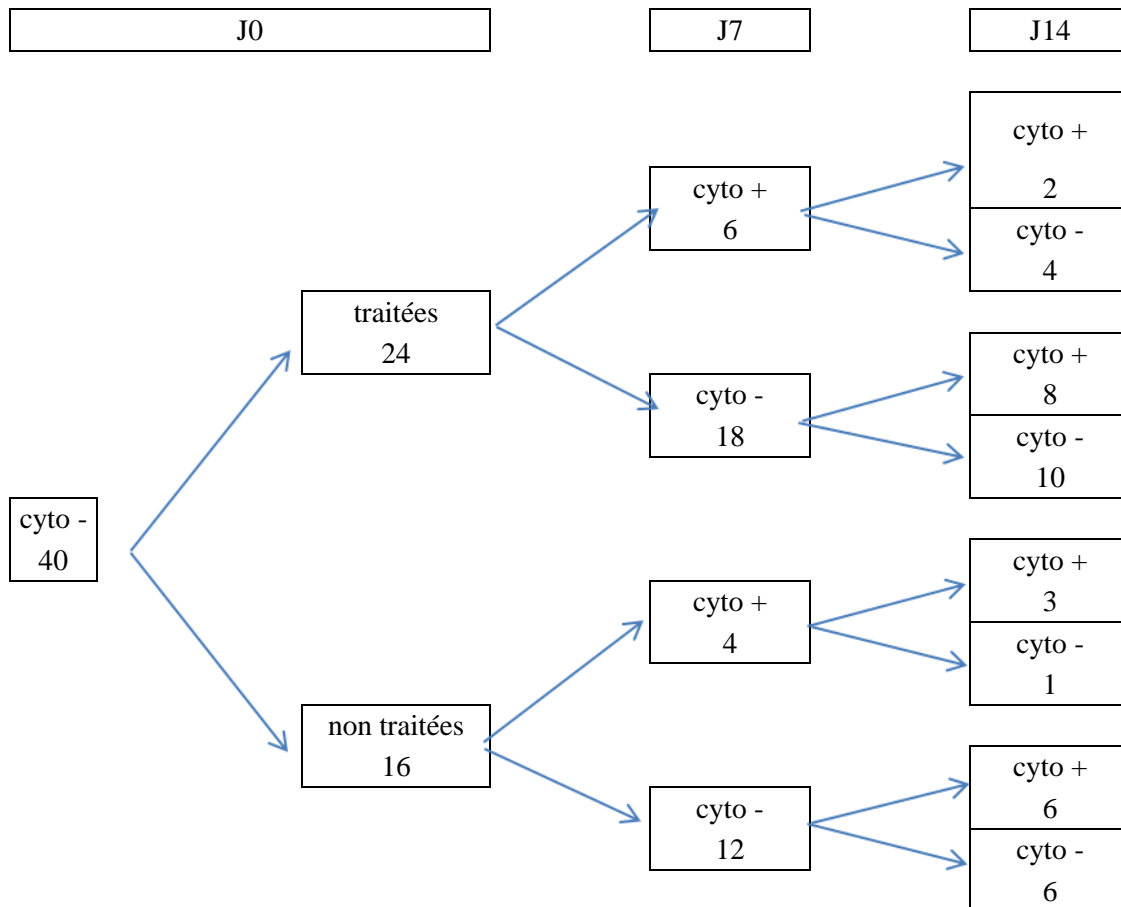
Tableau 10 : Comparaison de l'intensité de l'inflammation cervicale à J0 et J14, chez les vaches saines à J0 et traitées à la céfapirine (n=24)

Prélèvement	Médiane taux de neutrophiles cervical (%)	25 ^e percentile (%)	75 ^e percentile (%)
J0	1	0	1
J14	2	1	7,5

Figure 19 : Synthèse de l'évolution des vaches indemnes de cervicite cytologique à J0

Cyto + : Pourcentage cervical de GNN $\geq 5\%$

Cyto - : Pourcentage cervical de GNN $< 5\%$



III. Discussion

Le but de cette étude était d'examiner si l'administration de céfapirine par voie intra-utérine provoque une diminution de l'inflammation cervicale chez les vaches atteintes de cervicite subclinique entre 28 et 35 jours post-partum, et si elle permet d'améliorer les performances de reproduction de ces animaux.

1. Critique du protocole d'étude

1.1 Constitution de l'échantillon

La totalité des vaches de l'échantillon est de pure race Prim'Holstein, en élevage intensif. Quasiment toutes les études portant sur les cervicites et les endométrites ont été menées dans ces conditions (Gilbert *et al.*, 1998 et 2005 ; Kasimanickam *et al.*, 2005a ; LeBlanc *et al.*, 2008, Salasel *et al.*, 2010), même si d'autres auteurs ont étudié ces affections génitales dans d'autres conditions. C'est le cas de Plöntzke *et al.* (2010), qui se sont intéressés aux endométrites subcliniques chez des Prim'Holstein en élevage extensif ; la prévalence des endométrites cytologiques est voisine de celle des autres études (38%), mais l'influence sur les performances de reproduction n'a pas été prouvée. Dans notre étude, le seuil pathogène de l'inflammation cervicale choisi (5% de GNN) est celui défini par Deguillaume *et al.* (2012) dans les mêmes conditions expérimentales, soit pour des vaches laitières Prim'Holstein en élevage intensif, qui possède des mécanismes de l'immunité, un métabolisme énergétique et calcique semblables.

Leur répartition dans les trois élevages d'origine est hétérogène, tant sur le nombre de vaches par élevage que sur la durée de prélèvement dans chaque élevage. Les élevages 1 et 2, qui regroupent 34% (20/59) des vaches, respectivement 19% (11/59) et 15% (9/59) ont été prélevés pendant 3 mois, tandis que l'élevage 3, avec 66% (39/59) des vaches, l'a été pendant 5 mois.

Les notes d'état corporel des vaches à J0, les notes de mucus et le nombre d'IA par vache varient peu entre les trois élevages, tandis que la parité, les valeurs de progestéronémie à J0 et la durée de l'intervalle vêlage-1^{ère} IA diffèrent selon les élevages.

1.2 Détermination de la taille de l'échantillon

Lors de la mise en place d'une étude de prévalence, le choix de la taille de l'échantillon à prélever se fait en fonction de deux paramètres : la précision relative souhaitée et la prévalence attendue.

Beaucoup d'études ont porté sur la prévalence des endométrites subcliniques mais peu se sont intéressées à l'inflammation cervicale. C'est pourquoi il est difficile de donner une prévalence attendue précise des cervicites subcliniques. Deguillaume (2010) ainsi que Amate et Godard (2010) ont mis en évidence dans leurs études un taux de neutrophiles cervicaux supérieur à 5% chez respectivement 25% et 20% des vaches, prélevées par cytobrosse avant 35 jpp pour la première et au-delà de 90 jpp pour la seconde étude. Les vaches incluses dans notre étude étant entre 28 et 35 jpp, nous avons choisi d'utiliser la valeur obtenue dans l'étude de Deguillaume, soit 25% pour la prévalence attendue.

La précision relative, qui par définition est égale à la précision absolue rapportée à la prévalence attendue, est un paramètre déterminé par le réalisateur de l'étude, selon son besoin de précision et les moyens dont il dispose pour la mettre en œuvre. Dans cette étude, compte-tenu de la période consacrée aux prélèvements, des nombreuses manipulations à réaliser et des critères d'inclusion dans l'étude, il semble raisonnable de choisir une précision relative de 30%.

Selon Toma *et al.* (2001), pour une précision relative de 30% et une prévalence attendue de 25%, 129 sujets sont nécessaires.

Or, en pratique, au cours de la période de prélèvement, de janvier à juin 2010, seules 59 vaches ont répondu à tous les critères d'inclusion et ont donc été prélevées. C'est pourquoi l'échantillon d'étude est constitué de 59 vaches, ce qui est insuffisant pour obtenir la précision souhaitée des résultats.

Cependant, si on choisit une précision moindre, soit 50% de précision relative, il ne faut plus que 47 individus dans l'échantillon, ce qui est vérifié dans notre étude.

1.3 Traitement à la céfapirine

1.3.1 Choix de la molécule

La céfapirine est un antibiotique appartenant aux céphalosporines de 1^{ère} génération, son spectre d'action cible principalement les bactéries Gram positif et les bactéries anaérobies. Son activité est plus aléatoire sur les Gram négatif, car certaines possèdent des céphalosporinases.

Malinowski *et al.* (2011) se sont récemment intéressés à la sensibilité *in vitro* de différentes souches d'*A.pyogenes* et *E.coli* isolées chez des vaches atteintes de métrite ou d'endométrite cliniques entre 7 et 50 jpp. *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacteroides*, *Fusobacterium necrophorum* et *E.coli* sont les principaux contaminants bactériens de l'utérus (Williams *et al.*, 2005). Les souches d'*A.pyogenes* présentent une assez bonne sensibilité à la céfapirine (77,5%) et une excellente sensibilité à l'association amoxicilline/acide clavulanique (97,3%). *A. pyogenes* et *E.coli* seraient les plus résistants à l'oxytétracycline. Cependant, ces études considéraient les endométrites cliniques et ont été réalisées *in vitro*. Elles ne prenaient donc pas en compte toutes les interactions existantes entre les bactéries, la microflore utérine et le système immunitaire de l'animal. Sheldon *et al.* (2004b) ont établi que la concentration minimum inhibitrice (CMI) de la céfapirine était basse pour *A. pyogenes* et pour les bactéries anaérobies, mais élevée pour *E.coli*. Il ressort de cette étude que la céfapirine est désormais plus adaptée que l'oxytétracycline au traitement des affections génitales post-partum (métrites et endométrites cliniques), car les bactéries pathogènes du tractus génital présentent moins de résistances à celle-ci.

Différentes familles de molécules sont citées dans la littérature pour traiter les endométrites, avec pour but soit de favoriser la vidange utérine lors de l'utilisation des prostaglandines (PGF2 α) chez les vaches cyclées soit de lutter contre une probable infection bactérienne et diminuer ainsi l'inflammation associée, avec notamment des antibiotiques comme l'ampicilline, l'oxytétracycline, la néomycine ou l'association pénicilline/dihydrostreptomycine par voie systémique, ou la céfapirine par voie intra-utérine (Koujan *et al.*, 1996). En France, quatre spécialités possèdent une autorisation de mise sur le marché pour l'administration par voie intra-utérine : Métricure® (céfapirine), Métrijet® (pénicilline G + dihydrostreptomycine), Clamoxyl® métrite (amoxicilline) et Métrijectyl® (ampicilline+ colistine).

L'efficacité de l'administration intra-utérine de céfapirine sur les performances de reproduction a déjà été prouvée chez les vaches atteintes d'endométrite clinique (LeBlanc *et al.*, 2002a ; Runciman *et al.*, 2008 et 2009 ; McDougall *et al.*, 2001). On ne dispose actuellement que de peu de publications sur le traitement des inflammations génitales cytologiques et celles-ci ne concernent que les endométrites subcliniques. La céfapirine a permis de diminuer l'intervalle vêlage-insémination fécondante de 26 jours par rapport à des animaux non traités atteints d'endométrite subclinique (Kasimanickam *et al.*, 2005a). Néanmoins le traitement n'a pas permis d'augmenter le taux de réussite à la 1^{ère} IA ni de diminuer l'intervalle vêlage-1^{ère} IA.

Dubuc *et al.* (2010), quant à eux, ont montré sur 2178 Prim'Hosstein que l'injection d'une autre céphalosporine par voie générale (ceftiofur) permettait d'améliorer la qualité des sécrétions vaginales, facteur associé à la présence d'une endométrite ou d'une cervicite cytologique selon Deguillaume *et al.* (2012), tandis que l'injection répétée à 48h d'intervalle de prostaglandines F2 α n'améliorait en rien les performances de reproduction. Galvao *et al.* (2009) n'ont également observé aucune amélioration des performances de reproduction lors de traitement par voie intramusculaire avec des prostaglandines F2 α , des vaches atteintes d'endométrite subclinique à 35 et 49 jpp.

L'effet d'une injection unique intra-utérine de céfapirine, 24 à 42 jours avant la mise à la reproduction, sur les performances de reproduction de vaches avec un historique d'affections peripartum a été testé par McDougall (2001). La céfapirine était administrée aux vaches ayant présenté une complication post-partum indépendamment de la présence ou non de signes cliniques d'endométrites. Il en est ressorti une amélioration significative des performances de reproduction de ces animaux, en particulier des vaches ayant connu une rétention placentaire, un veau mort né ou un contenu vaginal anormal à l'examen vaginoscopique.

Compte-tenu de la fréquente présence pathogène d'*Arcanobacterium pyogenes*, bactérie Gram positif, dans l'utérus en post-partum et des preuves déjà établies de l'efficacité de la céfapirine sur l'amélioration des performances de reproduction lors d'endométrite clinique ou subclinique, il était intéressant de savoir si cet antibiotique est également efficace en cas de cervicite. De plus, la distinction entre cervicite et endométrite ne pouvant actuellement être réalisée sur le terrain, il serait très intéressant pour les praticiens de disposer d'une molécule efficace à la fois contre les inflammations du col et de l'utérus.

1.3.2 Caractère aléatoire du traitement

Trente-trois vaches de l'échantillon ont reçu 0,5 g de céfapirine par voie intra-utérine, tandis que 26 n'ont pas été traitées, ceci afin de constituer un lot de vaches traitées avec la molécule à tester et un lot témoin. Dans le protocole, il a été décidé qu'une vache sur deux recevrait de la céfapirine à J0, cette alternance se faisant dans l'ordre d'attache des animaux au cornadis. Les animaux s'attachaient d'eux-mêmes après la traite, avant que nous n'arrivions dans l'élevage, et les manipulations étaient toujours effectuées dans le même sens, du cornadis le plus proche du couloir central jusqu'à celui le plus éloigné.

Les animaux appartenant au groupe témoin répondent au critère « absence de traitement » et non « administration d'un placebo », car le cathétérisme du col utérin n'est pas un acte à banaliser, il s'accompagne toujours d'un risque de lésion du col voire du corps de l'utérus. C'est pourquoi l'absence de traitement a été choisie, pour ne pas réaliser cet acte technique plus que de besoin. De

plus, toutes les études déjà effectuées sur ce sujet utilisent un lot témoin « non traités » (McDougall *et al.*, 2001 ; LeBlanc *et al.*, 2002 ; Kasimanickam *et al.*, 2005a ; Runciman *et al.*, 2008 et 2009).

La différence d'effectif entre les deux lots (6 individus) vient du fait que d'un jour de prélèvement à l'autre, les manipulateurs ont terminé avec une vache traitée et recommencé lors de la suivante avec une vache également traitée. Cependant, cette différence n'altère pas la comparabilité des lots, puisque le test de Wilcoxon a montré que les deux lots n'étaient pas significativement différents ($p=0,762$) en considérant le critère « taux de GNN cervical ».

1.4 Choix de la cytologie et du mode de prélèvement

Les études sur les endométrites subcliniques de la vache utilisent deux techniques différentes pour le prélèvement des cellules de l'endomètre : le lavage utérin ou la cytobrosse. Certains auteurs comme Gilbert *et al.* (1998 et 2005), Santos *et al.* (2009) ou encore Galvao *et al.* (2009) utilisent le lavage utérin dans leurs études, tandis que d'autres préfèrent le prélèvement par cytobrosse. C'est le cas notamment de Kasimanickam *et al.* (2004, 2005b et 2006), Deguillaume (2007, 2010), Kaufmann *et al.* (2009) ou Baranski *et al.* (2009). Barlund *et al.* (2008) ont voulu comparer les résultats cytologiques obtenus par lavage utérin et par cytobrosse, sur 221 vaches Prim'Holstein, examinées entre 28 et 41 jpp. Ils ont montré que le prélèvement par cytobrosse présente une meilleure répétabilité que le lavage utérin et l'ont donc choisi comme méthode de référence. De plus, la technique utilisée pour lavage utérin ne permet pas de recueillir de liquide dans un nombre non négligeable de cas (17% pour Kasimanickam *et al.* 2005b)

De plus, l'étude de Barlund *et al.* (2008) montre que le diagnostic des endométrites par biopsie utérine est la méthode idéale, mais elle est invasive, coûteuse, chronophage donc difficile à utiliser en pratique sur le terrain. De plus, son innocuité sur les performances de reproduction est très discutée chez les auteurs qui s'y sont intéressés.

Bien que Ahmadi *et al.* (2006a) émettent l'idée que le prélèvement par cytobrosse récolte plus facilement des cellules épithéliales que des polynucléaires neutrophiles, la cytobrosse a été choisie dans notre étude pour l'analyse de la cytologie cervicale, avec le même mode opératoire que celui utilisé dans l'étude de Barlund *et al.* (2008), mais adapté au prélèvement cervical.

1.5 Analyse des performances de reproduction

Les résultats obtenus lors de cette étude n'ont pas permis de conclure quant à l'efficacité de la céfapirine sur l'amélioration des performances de reproduction, car de nombreuses données de reproduction n'ont pas pu être récupérées chez les éleveurs. Le nombre de vaches pour lesquelles les informations de reproduction sont complètes est trop faible pour réaliser une analyse statistique représentative.

Nous savons cependant qu'il a été démontré dans plusieurs travaux que l'endométrite subclinique est une affection qui pénalise les performances de reproduction de la vache laitière, avec par exemple un taux de réussite à la première IA de 11% chez les vaches atteintes contre 36% chez les saines, 63% de gestation à 300 jpp chez les vaches avec endométrite subclinique contre 89% chez les vaches saines (Gilbert *et al.*, 2005). Kasimanickam *et al.* (2004) montrent quant à eux que les endométrites subcliniques diagnostiquées par cytobrosse ou échographie augmentent l'intervalle vêlage-insémination fécondante de 50%. Le taux de non gestation à 150 jpp est 1,9 fois

plus élevé chez les vaches dont la cytologie utérine a plus de 8% de GNN entre 28 et 41 jpp que chez les autres dans l'étude de Barlund *et al.* (2008). C'est pourquoi il serait intéressant de connaître l'impact des cervicites cytologiques sur les performances de reproduction. Un plus grand nombre d'individus sur une plus longue période de prélèvement serait nécessaire pour établir l'efficacité de la céfapirine intra-utérine sur les performances de reproduction de vaches atteintes de cervicite subclinique entre 28 et 35 jpp.

De plus, dans notre étude, selon un accord avec les éleveurs, toutes les vaches recevaient une nouvelle dose de céfapirine à J14 après le dernier prélèvement ; il n'existe donc pas dans cette étude de lot témoin non traité pour l'analyse des données de reproduction.

1.6. Variabilité inter-opérateurs

La lecture des frottis a été réalisée par deux groupes d'opérateurs différents. La répétabilité des comptages cellulaires entre deux opérateurs est considérée comme bonne. En effet, Deguillaume (2010) a comparé les résultats des lectures de 168 frottis cervicaux par deux opérateurs différents, selon le même protocole de comptage que celui utilisé dans notre étude (voir Partie II, I, 5). Le coefficient de concordance de Lin a révélé une forte liaison entre les deux comptages ($\rho_c=0,85$). Cette même concordance avait été annoncée par Barlund *et al.* (2008), sur des frottis endométriaux, mais avec la lecture de seulement 100 cellules par lame.

2. Discussion sur les résultats

2.1. Prévalence des cervicites subcliniques

Notre étude a mis en évidence une prévalence de la cervicite subclinique de 32% (19/59), avec un taux de référence placé à 5% de GNN entre 28 et 35 jpp. Cette valeur est inférieure à celle obtenue dans les mêmes conditions expérimentales par Deguillaume *et al.* (2012), soit 42%. Elle est cependant supérieure aux 20% de cervicites subcliniques mises en évidence par Amate et Godard (2010), au seuil de 2% de GNN, 25 jours avant l'insémination.

Par comparaison, la prévalence des endométrites subcliniques rapportée dans la littérature varie d'une étude à l'autre, de 12 à 53%, selon la méthode diagnostique utilisée, le délai post-partum, le seuil de PNN pathologique défini et les critères d'inclusion dans l'étude, qui sont parfois assez flous (Kasimanickam, 2004 et 2005a ; Gilbert *et al.*, 2005 ; Deguillaume, 2007 et 2010 ; Barlund *et al.*, 2008 ; Salasel *et al.*, 2010 ; Amate et Godard, 2010).

Récemment Salasel *et al.* (2010) ont mené une étude sur la prévalence des endométrites subcliniques chez des vaches non gestantes après trois IA ou plus (syndrome appelé repeat breeding). Ils ont mis en évidence une forte prévalence des endométrites subcliniques (52,7% au seuil de 3% de GNN) dans cette population. De plus, cette étude a montré que chez les vaches repeat-breeders les endométrites subcliniques ont également un impact négatif sur les performances de reproduction, avec un taux de réussite à l'IA suivante de 47% chez les vaches saines contre 5% chez les vaches avec endométrite subclinique.

La totalité des études citées et quasiment toutes les études réalisées à ce jour s'intéressent aux endométrites subcliniques chez les vaches laitières en élevages intensifs, mais une équipe (Plontzke *et al.*, 2010) a voulu étudier cette affection dans un élevage extensif en Argentine. Ils ont

mis en évidence chez 201 vaches entre 18 et 38 jpp une prévalence des endométrites subcliniques de 38%, proche de celle des autres études, mais sans impact sur les performances de reproduction testées (réussite première IA, pourcentage de gestation à 360 jpp).

2.2. Effets de la céfapirine intra-utérine sur les cervicites subcliniques

Cette étude a montré que les vaches atteintes de cervicite subclinique présentent une inflammation cervicale significativement moins importante 14 jours après l'administration intra-utérine de céfapirine qu'avant. Cette amélioration n'est pas retrouvée 14 jours après le diagnostic cytologique de cervicite subclinique chez les vaches non traitées.

Cette étude a donc démontré qu'une administration unique de 0,5g de céfapirine par voie intra-utérine diminue significativement le degré d'inflammation cervicale chez les vaches atteintes de cervicite subclinique entre 28 et 35 jpp.

Il a de plus été mis en évidence que le traitement intra-utérin à la céfapirine n'induit pas d'inflammation cervicale chez les vaches saines 7 et 14 jours après traitement.

IV. Perspectives

1. Intérêt d'un traitement systématique à la céfapirine des vaches en post-partum

Cette étude a mis en évidence un intérêt cytologique à l'utilisation de céfapirine par voie intra-utérine, chez les vaches atteintes de cervicite subclinique au seuil de 5% de GNN entre 28 et 35 jpp. En pratique, cette méthode diagnostique impose la réalisation de frottis cervicaux suivie de la coloration et lecture des lames sur toutes les vaches cliniquement saines entre 28 et 35 jpp, ce qui est difficilement réalisable dans le cadre des suivis de reproduction classiquement menés en France à ce jour. Il serait donc intéressant de savoir si le traitement systématique (sans diagnostic préalable) des vaches cliniquement saines entre 28 et 35 jpp présente un intérêt pour l'amélioration de l'inflammation cervicale des animaux, dans le but d'améliorer les performances de reproduction du cheptel.

Dans notre étude, lorsqu'on administre 0,5g de céfapirine à toutes les vaches entre 28 et 35 jpp, quelque soit leur statut d'inflammation cervicale, aucune différence significative de niveau d'inflammation 14 jours plus tard n'a été observée.

Ainsi, le traitement systématique à la céfapirine ne permet pas d'améliorer l'inflammation cervicale globale des vaches du troupeau. Un diagnostic cytologique est indispensable entre 28 et 35 jpp pour réaliser un traitement personnalisé des vaches atteintes de cervicite subclinique, et améliorer l'inflammation cervicale de ces individus sous 14 jours.

D'autre part, il pourrait être intéressant de comparer les résultats obtenus lors de traitement à la céfapirine en fonction de l'intervalle vêlage-traitement. Runciman *et al.* (2008) ont démontré sur 1325 vaches à vêlages saisonniers que le traitement intra-utérin avec 0,5g de céfapirine, lors de contenu vaginal purulent, améliore les performances de reproduction si les animaux ont été traités moins de 28 jpp, en augmentant le taux de réussite à la 1^{ère} insémination et réduisant l'intervalle 1^{ère} insémination-insémination fécondante de 20 jours.

2. Intérêt de la métagénomique pour une antibiothérapie ciblée et personnalisée.

La technique utilisée dans cette étude pour caractériser une cervicite subclinique est la cytologie cervicale ; elle ne prend donc pas en compte la présence ou non de bactéries dans le col utérin. Ce protocole s'appuie sur la définition de l'endométrite subclinique donnée par Sheldon *et al.* (2006), qui est une définition cytologique puisqu'elle s'appuie sur la présence d'un certain taux de neutrophiles au frottis utérin, après 21 jpp.

A partir de 3 à 4 semaines post-partum, le nombre et la variété de bactéries dans l'utérus diminuent chez les vaches saines (Sheldon *et al.*, 2004). Plusieurs équipes se sont intéressées à la relation entre l'inflammation utérine et la présence de bactéries dans l'utérus. Sagartz et Hardenbrook (1971) ont isolé des bactéries dans 64% des utérus de 147 vaches infertiles, mais sans différence significative entre les utérus de vaches cliniquement atteintes de métrite ou de cervicite et les utérus des vaches cliniquement saines. Il existe des cas d'inflammation utérine sans infection, et inversement (Baranski *et al.*, 2009 ; Deguillaume 2010). Deguillaume (2010), en accord avec des publications antérieures, ne rapporte en effet aucune concordance entre l'inflammation utérine et la présence ou la pathogénicité des bactéries présentes dans l'utérus. Il apparaît alors nécessaire de savoir si la baisse des performances de reproduction rapportées dans les études est due à l'inflammation ou à l'infection, utérine ou cervicale. L'étude de Deguillaume (2010) remet également en cause la valeur diagnostique de l'écouvillonnage cervical, car seulement 20% des bactéries isolées sur les prélèvements cervicaux correspondaient aux contaminants utérins. Le col utérin, par sa position anatomique de frontière entre le vagin, ouvert sur le milieu extérieur, et le corps utérin, peut facilement être contaminé par des bactéries opportunistes et transitoires, dont le rôle sur l'inflammation cervicale n'est pas encore connu.

De plus, toutes les études qui ont étudié la contamination bactérienne utérine ou cervicale ont utilisé, en préalable à l'identification, la culture bactérienne. Or, il est maintenant connu que cette technique ne permet pas d'identifier toutes les espèces bactériennes présentes, car comme le rappelle Suchodolski (2011) pour la microflore intestinale du chat et du chien :

- Nous ne disposons pas d'informations assez précises sur les conditions de croissance optimale des bactéries,
- Les bactéries anaérobies sont facilement et fréquemment altérées lors de prélèvements ; donc leur potentiel de croissance *ex vivo* est altéré,
- Les milieux de culture ne permettent pas de reproduire les nombreuses interactions entre les microorganismes pathogènes et ceux de l'hôte, alors que celles-ci sont parfois nécessaires au bon développement des bactéries,
- Beaucoup de milieux de croissance utilisés manquent de spécificité. D'autres microorganismes que ceux recherchés peuvent y pousser,
- Enfin, les systèmes d'identification phénotypiques et biochimiques sont souvent insuffisants. Dans ce cas, le séquençage des isolats est alors indispensable.

Pour toutes ces raisons, d'autres méthodes d'identification des microorganismes sont actuellement développées, notamment l'analyse moléculaire par extraction d'ADN ou d'ARN, puis amplification d'un gène par PCR, grâce à un promoteur universel qui cible des régions conservées de ce gène. Par exemple, pour l'identification des bactéries, le gène le plus souvent ciblé est celui qui code pour la synthèse de l'ARN ribosomal 16S (Suchodolski, 2011).

Bien que plus performante que la culture bactérienne, l'analyse moléculaire donne parfois des résultats biaisés du fait de l'utilisation de promoteurs variés ou de méthodes d'extraction de l'ADN différentes selon les équipes, et elle ne donne des renseignements que phylogéniques, les propriétés fonctionnelles des bactéries restant inconnues. L'amplification par PCR peut également introduire des biais dans la quantification des groupes de bactéries.

La méthode la plus performante est donc actuellement la métagénomique, éventuellement associée à la transcriptomique. La métagénomique consiste en l'extraction d'ADN puis séquençage aléatoire, sans étape d'amplification, ce qui permet de caractériser tous les gènes présents dans l'échantillon, de l'hôte et de la bactérie. On obtient ainsi un métagénome, qui est une collection de tous les gènes de l'hôte et des bactéries présents dans le prélèvement. La transcriptomique est basée sur le même principe, mais à partir d'ARN, ce qui apporte des informations sur l'expression des gènes de l'hôte et des bactéries présentes.

Deguillaume (2010) n'a obtenu de culture bactérienne que pour 11% des vaches présentant une inflammation cervicale pathologique au seuil de 5% de GNN. Il semble donc raisonnable de penser que la culture bactérienne n'est pas adaptée à la microflore du col utérin. Celle-ci est par ailleurs assez similaire à la microflore du tube digestif, par l'important nombre de bactéries qui s'y développent, notamment des anaérobies.

L'utilisation des techniques de métagénomique serait donc intéressante pour découvrir le véritable lien qui existe entre l'inflammation cervicale et l'infection cervicale et l'importance relative de ces deux phénomènes. Des études portant sur l'efficacité d'un traitement anti-inflammatoire en cas de cervicite cytologique permettraient également d'améliorer les connaissances sur l'importance relative de l'infection et de l'inflammation du col utérin.