

# PARTIE EXPÉRIMENTALE : Efficacité de la céfapirine par voie intra-utérine sur l'inflammation cervicale

L'efficacité de la céfapirine sur les endométrites subcliniques ayant été prouvée (Kasimanickam *et al.*, 2005a), le but de cette étude était de tester l'efficacité de cet antibiotique, administré une seule fois, par voie intra-utérine, entre 28 et 35 jpp, sur la réduction de l'inflammation cervicale chez la vache laitière.

## I. Matériels et méthodes

### 1. Constitution de l'échantillon d'étude

#### 1.1. Elevages d'origine et période d'étude

Les 59 vaches recrutées pour cette étude proviennent de trois fermes de la région parisienne, toutes situées dans le département des Yvelines (78). La ferme expérimentale de Grignon (AgroParisTech, Elevage 1) à Thiverval-Grignon (78850), possède 126 vaches en lactation, une production laitière mensuelle de 10844 kg, avec un taux butyreux (TB) de 38,9 g/L et un taux protéique (TP) de 31 g/L. La ferme de La Tremblaye (Elevage 2), située à La Boissière-Ecole (78125), élève 120 vaches en lactation pour, en moyenne mensuelle, une production laitière de 11055 kg, un TB=38,5 g/L et un TP=32,3 g/L. Enfin, la ferme de Bissy (Elevage 3), sur la commune de Bonnelles (78830), compte 280 vaches en lactation avec par mois, en moyenne, une production de 10 000 kg de lait, un TB = 36,9 g/L et un TP = 31,1 g/L. Toutes ces données sur la production laitière sont valables pour 2010, l'année de prélèvement.

Les manipulations ont été réalisées en deux temps : un premier binôme (Audrey Gutierrez et Arnaud Chatry) a recruté trente vaches réparties dans les trois élevages, du 22 janvier 2010 au 15 avril 2010, au cours des suivis de reproduction organisés par l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Les vingt-neuf autres vaches ont été prélevées par un second binôme (Barbara Daragon et moi-même), chaque samedi, du 24 avril 2010 au 19 juin 2010, à la ferme de Bissy. Cette séparation du travail a permis de recruter cinquante-neuf vaches répondant aux critères d'inclusion du protocole, du 22 janvier 2010 au 19 juin 2010.

#### 1.2. Critères d'inclusion des animaux

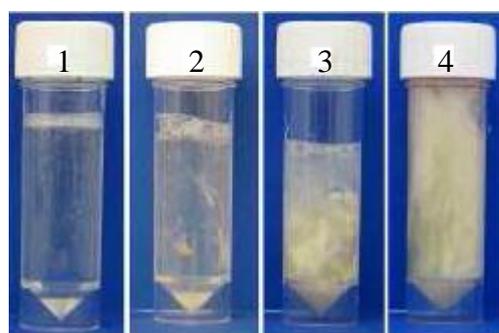
Les vaches recrutées dans cette étude étaient toutes des vaches laitières de race Prim'Holstein. Chaque élevage était visité une fois par semaine.

Pour être sélectionnée, une vache devait :

- avoir vêlé entre 28 et 35 jours auparavant,
- être indemne d'endométrite clinique (voir plus loin),
- ne pas avoir subi d'avortement,
- ne pas être programmée pour la réforme dans les deux semaines suivantes.

Pour exclure de l'étude les vaches atteintes d'endométrite clinique, un examen des sécrétions vaginales était réalisé à J0 sur toutes les vaches susceptibles d'être incluses, après recueil du contenu vaginal à l'aide d'un gant d'examen gynécologique en film plastique (Digitil S, Hartmann, Sélestat, France). Les sécrétions recueillies étaient examinées et classées en quatre niveaux, selon la classification de Williams *et al.* (2005), illustrée par la figure 7 : (0) absence de mucus (1) translucide, (2) présence de flocons, (3) présence de pus < 50% et (4) pus > 50%. Les vaches des catégories (1) et (2) étaient considérées saines et incluses dans le protocole.

Figure 7: Classification du mucus vaginal proposée par Williams *et al.* (2005)



Proportion de pus :

- (1) : Mucus clair et translucide
- (2) : Mucus contenant des flocons blancs
- (3) : Moins de 50 mL d'exsudat contenant moins de 50% de matériel mucopurulent, blanc
- (4) : Plus de 50 mL d'exsudat contenant du pus blanc ou jaunâtre et occasionnellement sanguinolent

En accord avec les éleveurs, aucune des vaches incluses dans l'étude n'était manipulée lors des suivis de reproduction organisés par l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pendant la durée de l'étude, afin de ne pas risquer de modifier le degré d'inflammation du col utérin lors des manipulations.

## 2. Evaluation de l'état corporel

Dès qu'une vache était incluse dans l'étude, à J0, son état corporel était évalué par un manipulateur, toujours le même dans chaque binôme. L'évaluation était basée sur une grille de notation de 0 (cachexique) à 5 (très grasse), définie par l'Institut technique de l'élevage (Annexe 1).

## 3. Prélèvements sanguins pour dosage de la progestéronémie

Une prise de sang a été effectuée sur chaque animal, avant chaque prélèvement cytologique, à l'aide d'une aiguille de 18-gauge et un tube Vacutainer de 5 mL contenant de l'EDTA. La ponction était réalisée dans la veine coccygienne. Les tubes étaient ensuite centrifugés à la vitesse

de 4000 tours/minutes pendant 5 minutes, puis le plasma était congelé à -20°C jusqu'au dosage de progestéronémie par ELISA et chemiluminescence sur un automate (Enzymun-Test Progesterone, Roche, Meylan, France). Un taux de progestérone (P4) supérieur à 3,2 nmol/l (1 ng/ml) attestait la présence d'un corps jaune fonctionnel, selon le seuil établi par Battochio *et al.* (1999). Les résultats de progestéronémie seront à mettre en relation avec la prévalence de cervicites chez les vaches de l'étude.

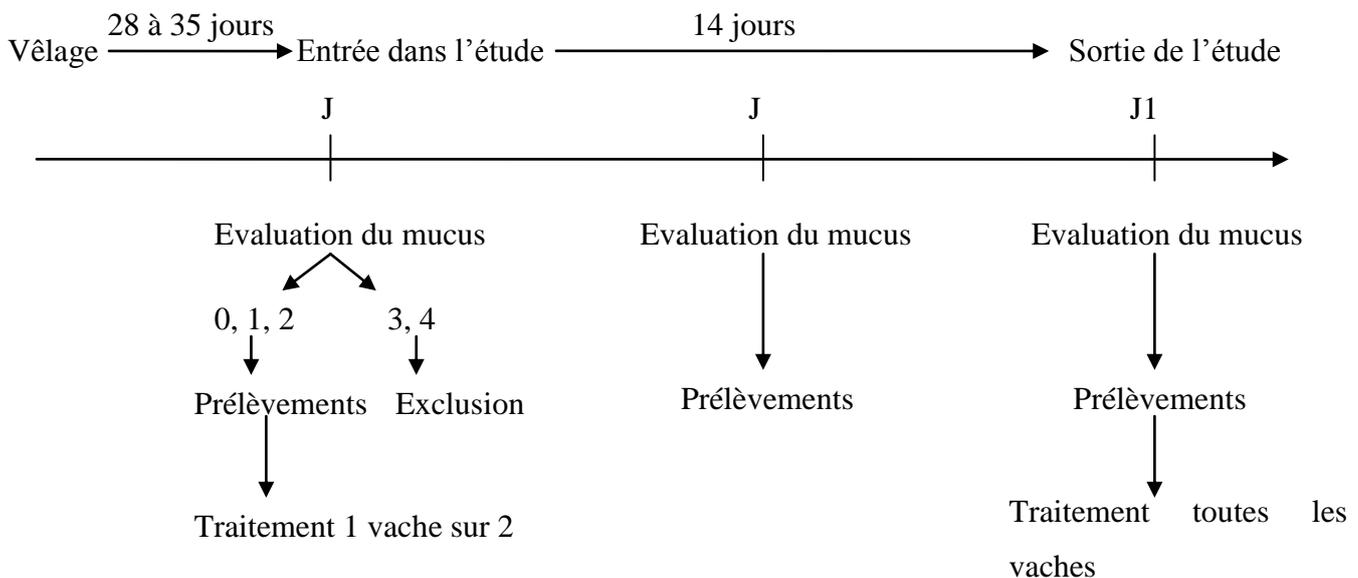
#### 4. Prélèvements cytologiques cervicaux

Cette étape du protocole permettait de recueillir des cellules de la muqueuse du col utérin, pour réaliser ensuite un frottis dont la lecture permettait de définir le degré d'inflammation cervical.

##### 4.1. Rythme de prélèvement

Sur chaque vache recrutée, trois prélèvements cytologiques cervicaux ont été réalisés. Le premier était effectué le jour d'inclusion de l'animal dans le protocole (J0) quand il répondait aux critères de recrutement. Le second était effectué sept jours plus tard (J7), quelque soit le résultat de l'examen vaginal, puis le troisième était réalisé encore sept jours plus tard (J14), soit quatorze jours après son entrée dans l'étude et encore une fois indépendamment du score vaginal. Le mucus cervical était recueilli et étudié à chaque prélèvement, mais à J7 et J14, il ne déterminait donc pas la réalisation ou non du frottis, qui était systématiquement pratiqué. La figure 8 synthétise les étapes du protocole.

Figure 8 : Schéma chronologique synthétisant les étapes du protocole

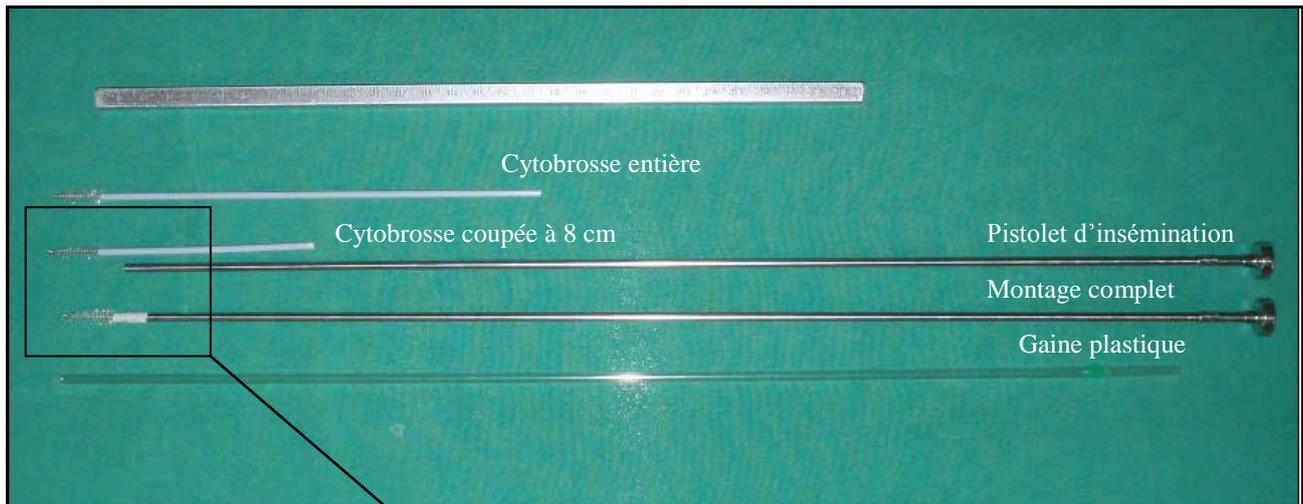


##### 4.2. Matériel utilisé

Le frottis cervical était réalisé à l'aide d'une cytobrosse stérile (Cytobrush®Plus GT, Medscand®Medical, redistribuée par Alcyon, Paris, France), dont la tige plastique était coupée à 8 cm environ de l'extrémité de la brosse. Cette cytobrosse était insérée dans un pistolet d'insémination artificielle (IMV Technologies, L'Aigle, France), en acier inoxydable, dont le diamètre interne est de 3 mm. Elle était fixée au pistolet par un morceau d'Adhéroplaste®Fibranne

(BSN Medical, Vibraye, France), dont la taille était déterminée de façon à ne pas gêner le coulissement ultérieur du pistolet. Le tout, présenté dans la figure 9, était inséré dans une gaine plastique d'insémination artificielle (IMV Technologies), à usage unique, pour éviter les contaminations de la cytobrosse lors de son insertion jusqu'au canal cervical. Enfin, ce montage était protégé par une chemise sanitaire (IMV Technologies), mise en place juste avant chaque prélèvement, pour minimiser les risques de contaminations vaginale et cervicale par des agents du milieu extérieur.

Figure 9 : Montage de la cytobrosse et du pistolet d'insémination pour les prélèvements cervicaux  
(Unité de Reproduction, ENVA)



### *Détail de l'extrémité du montage*



## 4.3. Technique de prélèvement

### 4.3.1. Préparation de la zone vulvaire

Le nettoyage de la zone vulvaire était une étape importante, pour éviter les contaminations d'origine fécale, vulvaire ou environnementale. Dans ce but, plusieurs lavages étaient effectués : les

plus grosses salissures étaient retirées avec du papier absorbant mouillé à l'eau tiède, puis un lavage était réalisé avec du savon dermatologique (Hibitane savon, Molnlycke Health Care, Bedfordshire, Royaume-Uni) et de l'eau tiède. La vulve était ensuite essuyée et pulvérisée d'une solution de chlorhexidine (Hibitane solution, Molnlycke Health Care). Pendant toute la préparation, un aide tenait la queue de la vache à l'écart de la zone vulvaire.

#### 4.3.2. Ecouvillonnage cervical

L'ensemble du montage était introduit par voie vaginale puis guidé jusqu'à l'ostium externe du col sous contrôle transrectal. Le manipulateur faisait alors pénétrer le montage dans le canal cervical, entre le deuxième et le troisième anneau. La chemise sanitaire était alors perforée et l'extrémité du pistolet contenant la cytobrosse poussée hors de la gaine plastique. La cytobrosse était ensuite appliquée contre la paroi du col, puis un mouvement de rotation dans le sens des aiguilles d'une montre permettait de prélever les cellules cervicales. Pour éviter toute contamination de l'échantillon lors du retrait du montage, l'extrémité du pistolet avec la cytobrosse était rétractée dans la gaine avant l'extraction du montage hors du vagin.

#### 4.3.3. Réalisation et coloration des frottis

Le frottis était réalisé sur place, immédiatement après le prélèvement de l'échantillon. Cette opération était toujours réalisée par le même opérateur. La cytobrosse était roulée dans la longueur de la lame, par un mouvement régulier, sans exercer de pression importante sur la lame. Pour qu'une grande surface de lame soit recouverte par des cellules, ce mouvement était réalisé deux fois sur une même lame, mais sur des zones qui ne se superposaient pas. Pour chaque prélèvement, deux frottis étaient réalisés selon cette même technique.

Si le prélèvement était visuellement riche en globules rouges, une première lame « brouillon » était réalisée, puis les deux lames définitives étaient préparées.

Toutes les lames ont ensuite été colorées à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, par un automate du Laboratoire des Cliniques (modèle Aerospray, marque Wescor, Kitvia, Labarthe Inard, France). Elles ont été colorées par la méthode de May-Grünwald-Giemsa.

### 5. Traitement intra-utérin

Lors du premier prélèvement, à J0, une vache sur deux recevait par voie intra-utérine 0,50 g de céfapirine (Metricure, MSD, Beaucauzé, France). Les manipulations étaient toujours effectuées dans le même sens, du cornadis le plus proche du couloir central jusqu'au fond de la stabulation. L'appartenance au groupe traité ou témoin dépendait donc de l'ordre d'attache des vaches au cornadis (attache spontanée, non contrôlée), selon l'alternance systématique une vache traitée / une vache non traitée.

La dose de céfapirine était toujours injectée dans le corps utérin (selon les préconisations de l'Autorisation de Mise sur le Marché) par l'intermédiaire du cathéter plastique fourni avec la spécialité contenant la céfapirine, après cathétérisme du col sous contrôle transrectal.

## 6. Mise à la reproduction des vaches du protocole

Les vaches étaient retenues dans le protocole pendant quatorze jours après le recrutement, au cours desquels les éleveurs s'engageaient à ne pas les mettre à la reproduction, ni les faire examiner par l'Ecole, ni leur administrer de traitement systémique ou local. À l'issue des quatorze jours, toutes les vaches recevaient 0,50 g de céfapirine par voie intra-utérine. Leur mise à la reproduction était ensuite gérée selon les habitudes des élevages. Classiquement, l'insémination artificielle avait lieu après une période d'attente volontaire d'au moins 50 jours post-partum, soit 15 à 22 jours après traitement. Les diagnostics de gestation étaient réalisés entre 30 et 45 jours post-insémination par échographie transrectale (sonde 6 MHz ; Aquila, Pie Medical, Hospimedi, Poisy, France), lors des suivis de reproduction effectués par l'Unité de Reproduction de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort. En cas d'anomalie de la cyclicité ou de syndrome repeat-breeding, les vaches étaient examinées et traitées selon les conclusions de l'examen de l'appareil génital.

## 7. Lecture des frottis

La lecture des lames de frottis a été effectuée par deux binômes de manipulateurs différents, qui utilisaient la même méthode de lecture. Chaque binôme a lu les frottis qu'il avait réalisés, lors de la période de prélèvement.

La lecture débutait par le grossissement x100, pour évaluer l'homogénéité de la lame et la présence ou non de sang qui pourrait gêner la lecture détaillée. Celle-ci permettait de choisir une zone représentative pour la lecture détaillée qui s'effectuait au grossissement x1000, avec de l'huile à immersion. La lame était lue en effectuant des créneaux classiques de lecture des frottis, s'étirant idéalement d'un bord à l'autre de la lame. Deux cent cellules étaient comptabilisées par lame. Pour une meilleure fiabilité, le comptage des cellules était facilité par un compteur cellulaire et une fiche type récapitulant le nombre de cellules comptées par type cellulaire était remplie au fur et à mesure.

Trois types de cellules étaient comptés : les cellules épithéliales (figure 10), qu'elles soient agranulaires, granuleuses ou squameuses, les granulocytes neutrophiles (GNN ; figure 11) et les autres types de leucocytes qui étaient regroupés en une seule catégorie.

Pour être comptée, une cellule devait avoir un noyau bien visible, un cytoplasme et une membrane visibles et intègres. En cas d'amas tridimensionnel de cellules, il était admis de ne compter que dix cellules maximum par amas, toutes bien reconnaissables et intègres. Tout débris végétal ou animal, noyau seul, cellule à morphologie altérée, cellule fusiforme isolée ou en paquet évoquant un fibroblaste n'était pas compté.

Les cellules anucléées telles que les hématies et les squames n'étaient pas comptées, mais la contamination sanguine était évaluée selon la notation suivante : (0) pas d'hématie, (+) quelques hématies, (++) plusieurs plages de lecture fortement hémorragiques et (+++) cellules à compter toutes incluses dans ces plages hémorragiques et de morphologie altérée.

La contamination bactérienne (figure 12), était également évaluée, selon une gradation de (0) aucune bactérie visible à (+++) bactéries reconnaissables sur toutes les plages de lecture. La présence d'image de phagocytose était également notée. En cas d'impossibilité de lecture du frottis, quelque soit la cause (nombre de cellules reconnaissables trop faible, contamination trop importante), la lame double était colorée et lue à son tour.

Figure 10 : Cellules épithéliales intègres (Unité de Reproduction, ENVA)

Figure 11 : Nombreux granulocytes neutrophiles, visibles sur un frottis cervical (Unité de Reproduction, ENVA)

Figure 12 : Bactéries libres et intracytoplasmiques, visibles sur certains frottis cervicaux (Unité de Reproduction, ENVA)

Figure 10

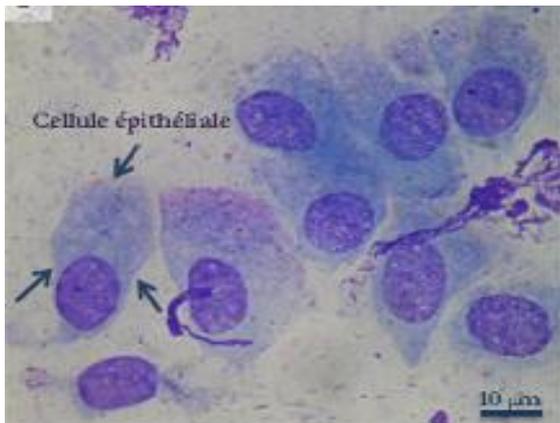
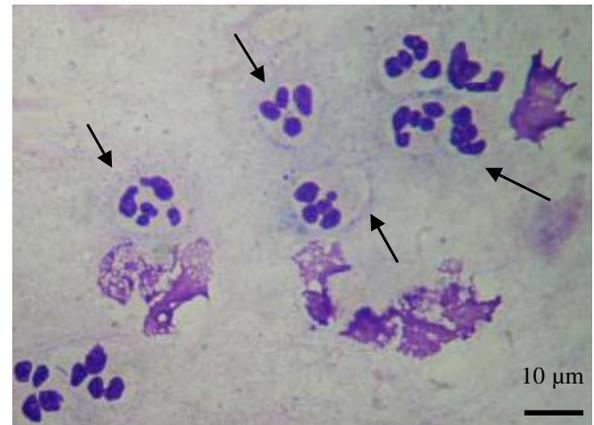
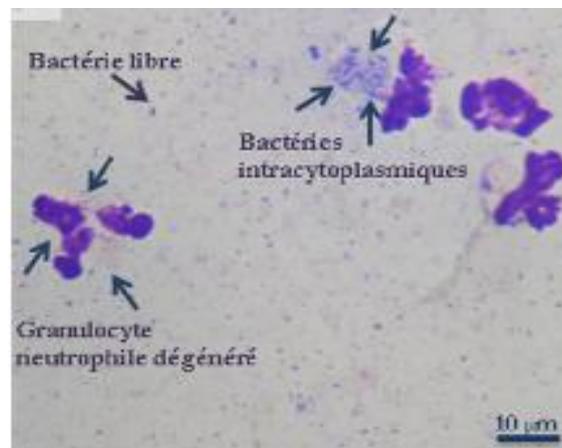


Figure 11



→ Granulocytes neutrophiles (PNN)

Figure 12



## 8. Collecte et saisie des données

### 8.1. Collecte

La collecte des données a été effectuée en deux temps.

En premier lieu, chaque jour de manipulation, une fiche type était amenée dans l'élevage et remplie sur place, au fur et à mesure des prélèvements, afin d'assurer un parfait suivi du protocole et la traçabilité des prélèvements. Cette fiche (Annexe 2) renseignait le numéro des vaches à

prélever et pour chaque vache, le numéro de sa prise de sang, le résultat de l'examen vaginal, les numéros de ses lames, si elle était ou non traitée à la céfapirine, ainsi que d'éventuelles remarques.

En second lieu, la collecte des résultats de reproduction des vaches entrées dans le protocole se faisait à partir de fiches bilan établies à la fin de chaque suivi de reproduction organisé par l'Ecole Vétérinaire dans les élevages concernés.

## 8.2. Codage et saisie

Toutes les données collectées ont été regroupées dans un tableau récapitulatif créé à partir du logiciel de traitement de données Excel (Excel®, version 2003-2007, Microsoft Corporation, Issy-les-Moulineaux, France). Ce tableau était complété au fur et à mesure des manipulations puis des suivis de reproduction. Il est le support de base de l'analyse statistique. La liste des variables utilisées est donnée en annexe 3. A partir du tableau récapitulatif organisé par date de prélèvement, un second tableau a été créé pour les besoins de l'analyse statistique, celui-ci organisé par vache prélevée.

## 9. Traitement des données : description et analyse statistique

Le traitement des données été réalisé dans un premier temps grâce au logiciel Excel, pour créer un tableau synthétique descriptif des résultats. Il a permis d'étudier l'évolution de la répartition des animaux au cours des trois prélèvements pour la variable étudiée, à savoir le taux de neutrophiles cervical obtenu par frottis, en fonction du facteur « traitement intrautérin à la céfapirine » ou « pas de traitement ».

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une analyse statistique univariée grâce au logiciel SAS, version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA, 2002), étudiant l'association entre la variable d'étude « traitement » et notre test de référence, la cytologie cervicale. La comparaison des résultats était basée sur le calcul des médianes ; les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. La puissance de cette association a été analysée à l'aide du test de Wilcoxon à deux échantillons. L'association était considérée significative pour des valeurs de p inférieures à 0,05.