

La myéloperoxydase dans l'utérus de la jument : au-delà du diagnostic d'endométrite

Myeloperoxidase in the Mare's Uterus: Beyond Endometritis Diagnosis



Sonia PARRILLA HERNÁNDEZ

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat en Sciences Vétérinaires
Année académique 2024-2025



UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT CLINIQUE DES EQUIDES
SERVICE D'OBSTETRIQUE ET DE PATHOLOGIES DE LA REPRODUCTION

**La myéloperoxydase dans l'utérus de la jument :
au-delà du diagnostic d'endométrite**

**Myeloperoxidase in the Mare's Uterus:
Beyond Endometritis Diagnosis**

Sonia PARRILLA HERNÁNDEZ

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTORAT EN SCIENCES VETERINAIRES

ANNEE ACADEMIQUE 2024-2025

*Science progresses best
when observations force us
to alter our preconceptions.*

Vera Rubin

*There are two possible outcomes:
if the result confirms the hypothesis, then you've made a measurement.
If the result is contrary to the hypothesis, then you've made a discovery.*

Enrico Fermi

... Est-ce que tu ne pouvais pas m'épargner cela ? »

Il entendit le vent lui répondre : « Non. Si je te l'avais dit, tu n'aurais pas vu les Pyramides. Elles sont très belles, tu ne trouves pas ? »...

L'Alchimiste, Paulo Coelho

À mes parents

Aux juments

Remerciements

Mon parcours de doctorat, le mien, ce chapitre de ma vie, a peut-être été long, mais il m'a offert bien plus de rencontres et de découvertes que je ne l'aurais jamais imaginées. Il a été marqué par de nombreuses personnes qui m'ont accompagnée, que ce soit tout au long du chemin ou sur une partie seulement. Je souhaite avant tout remercier sincèrement et chaleureusement toutes ces personnes pour les précieux apprentissages qu'elles m'ont apportés, tant dans le domaine scientifique que dans de nombreux autres aspects de la vie.

*Je souhaite tout d'abord adresser mes plus sincères remerciements au Professeur **Stéfan Deleuze**, mon promoteur, qui m'a accompagnée tout au long de ma carrière. Tu as été mon formateur, mon superviseur, mon chef, mais surtout mon mentor. Merci d'avoir cru en moi bien au-delà de ce que j'étais capable de faire moi-même et de m'avoir accompagnée toutes ces années. Nous refermons ici un chapitre. Un sacré chapitre.*

*Je tiens également à exprimer ma gratitude à mon co-promoteur, le Professeur **Didier Serteyn**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse de doctorat, qui m'a permis d'approfondir ma réflexion et d'affiner mon esprit critique.*

*Je suis également reconnaissante envers mon comité de thèse pour son soutien et son accompagnement tout au long de ce parcours. Un immense merci au Dr **Thierry Franck**, dont la disponibilité et l'engagement envers la recherche ont toujours été inspirants : ton émerveillement face à la découverte est contagieux. Mes plus sincères remerciements vont également au Professeur **Jean-François Beckers** : votre soutien et vos conseils avisés m'ont été d'une aide précieuse. Vous m'avez appris ce qu'est l'empathie dans l'accompagnement ; la vôtre a été un moteur puissant qui m'a poussée vers l'achèvement de ce doctorat. Je compte mettre en pratique cet apprentissage tant dans ma vie personnelle que professionnelle.*

Je tiens également à remercier toutes les autres personnes, proches ou éloignées, qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet :

*Merci au Dr **Jérôme Ponthier** pour m'avoir accompagnée sur une partie de ce parcours. Tes premières relectures, tes corrections, tes conseils et ton avis ont été d'une grande aide. Merci aussi à mes collègues de LINALUX-MLS, en particulier à **Jérémy**, à **Audrey** et à **Marie-Ca**, pour votre aide lors des prélèvements et pour tout le reste. Merci encore à toute l'équipe de la Clinique Équine de la FMV pour tout ce que vous m'avez apporté, de près ou de loin. Merci à **Joëlle** pour ton travail avec les lames et tes précieux conseils techniques, ainsi qu'à toute l'équipe histo pour avoir pris le temps de répondre à mes questions. Merci à **Dominique Cassart** pour les lames témoins et sa disponibilité constante à l'entraide. Merci à **Cécile Douet***

*pour ses analyses et les brainstormings pour tenter de comprendre le « pourquoi ». Merci à **Fabrice Reignier** et à **Philippe Barrière** pour les prélèvements sur les ponettes. Un grand merci au Professeur **Carine Munaut** pour la belle collaboration. Merci à **Émilie Feyereisen** pour l'IHC. J'admire ta persévérance, grâce à laquelle nous avons trouvé le bon protocole. Merci à **Frédéric Farnir**, **Evelyne Moyse** et **David Stern** pour votre aide dans mes analyses statistiques. Merci à **Sophie** et à **Véro** pour les images. Merci à **Alan** et à **Laurent** pour leur aide graphique, vous m'avez fait gagner un temps précieux. Merci à **Vinciane** pour ton soutien constant, tes relectures et ton aide avec le vocabulaire, car il n'est pas toujours évident de trouver les mots justes dans un domaine et une langue qui ne sont pas les miens. Merci également à **Catherine** d'avoir pris le temps d'apporter un regard extérieur, de relire mon travail et, surtout, pour ton écoute attentive et tes mots justes qui m'ont énormément rassurée sur le travail accompli. Merci à **Ilham** pour ta disponibilité, pour ton aide inestimable dans la gestion pratique et administrative de ce projet, ainsi que pour ton côté humain. Et enfin, merci à **Raja** pour tes conseils pratiques, pour m'avoir encouragée sans relâche à persévirer et pour tout le travail de relecture, non seulement du manuscrit final, mais aussi tout au long du processus. Merci infiniment, non seulement pour ta disponibilité dans la finalisation de la thèse (même après ta retraite bien méritée), mais surtout pour avoir souhaité m'accompagner jusqu'à la fin.*

A huge thank you to the wonderful women of the Mindful Co-Writing group. You have been my rock throughout the thesis-writing process. Moving forward together has made everything so much easier. Thank you for being there on the other side of the screen. What a gift it has been to belong to this group, to move forward together, to support and encourage each other, to feel understood, never alone, and to celebrate each other's successes as if they were our own. You are all amazing!

*Je voudrais aussi remercier l'équipe de femmes fortes, intelligentes et incroyables qui, guidées par le Professeur Tatiana Art, m'a accueillie au sein du Service de Physiologie comme si j'étais déjà l'une d'entre elles. Vous m'avez redonné espoir dans le travail en équipe, la bienveillance professionnelle et l'entraide comme une force, merci. Plus particulièrement, je voudrais remercier **Tania** pour avoir cru en moi et pour continuer à croire en ce que je peux apporter. À **Ire** pour nos moments de décharge émotionnelle, et pour nos délires dans les couloirs, que ce soit tôt le matin ou tard le soir, quand nous n'étions que toutes les deux. Ces instants étaient des souffles d'air. À **Raja** et **Ilham** pour ce qui a été dit, mais aussi parce que vous me faites sentir que je continue à appartenir, même si je ne fais plus partie de l'équipe. À **Aline**, quel plaisir de travailler avec quelqu'un à qui l'on peut dire ce qui ne va pas, sachant que sa réaction sera toujours d'essayer de trouver une solution ou une meilleure manière de faire. Et enfin, un*

grand merci à **Carine**, ma partenaire au travail. Toujours présente dans les moments importants. À tout ce que nous avons accompli ensemble, toujours dans la bonne humeur et avec beaucoup de passion. Merci, merci pour tout.

À mon équipe actuelle, **Sophie, Laurent, Maxime, France, Véro, Catherine, Vinciane et Tiber**. C'est tellement agréable de travailler avec vous, dans le respect, la bonne ambiance, l'entraide et l'envie de faire avancer des projets communs, tout en soutenant les projets individuels de chacun. Merci !

Je tiens également à remercier toutes les personnes que je n'ai pas mentionnées spécifiquement. Votre soutien, vos encouragements et vos contributions ont été essentiels à l'accomplissement de ce projet et je vous en suis particulièrement reconnaissante.

Merci **Malou**, d'avoir toujours été là, présente, du début jusqu'à la fin.

Merci à mes amies « ardennaises » et à leurs chères familles. **Fanny, Vinie**, vous êtes ma famille choisie, ma tribu dans ce pays qui n'est pas le mien mais qui grâce à vous, ou à cause de vous, j'ai commencé à appeler « la maison ». Nos conversations, nos folies, nos écoutes et le respect de ce qu'est chacune malgré nos différences me comblient. Merci pour chaque moment, dans les hauts et dans les bas. Merci pour votre soutien, pour la relecture du manuscrit et pour la correction du français, même si cela vous obligeait parfois à chercher le sens d'un mot sur trois.

Me gustaría utilizar mi lengua materna para mostrar mi gratitud hacia mi familia de origen. Estás tan lejos y, sin embargo, os siento siempre tan cerca. Gracias por estar ahí. **Moru, Omar, Wendy, Ximo** y todos los que os acompañan... tengo tanta suerte. Soy un poquito de cada cosa que admiro de cada uno de vosotros y que me ha permitido tomar prestado. **Mamá, Papá**, no solo me habéis dado la vida, también me habéis permitido vivirla a mi manera y me habéis enseñado a disfrutarla. Me habéis apoyado en mis decisiones, estando o no de acuerdo, dejándome equivocarme y acertar, pero con la mochila llena de herramientas para levantarme y seguir adelante. La resiliencia me la habéis enseñado vosotros, y sin ella, esto no hubiera sido posible. Gracias.

Je voudrais finir par remercier mes amours. Ma petite fée des bois, mon être merveilleux, mon ancrage... **Ianna**, c'est pour toi et grâce à toi que cette thèse est finalisée. J'apprends tellement de toi... Et toi, **Nick**, mon compagnon de vie. Merci d'avoir vécu ces années de thèse à mes côtés, de m'avoir soutenue dans les moments de stress et d'incertitude, d'avoir pris soin de moi, de nous, dans les moments les plus difficiles, me poussant toujours à aller de l'avant, tout en me faisant sentir que cela serait aussi bien si je décidais autrement. C'est tellement précieux. Cette thèse est aussi la tienne.

Abréviations

| | |
|-----------------------------------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messager |
| C3 | Facteur 3 du complément |
| CCL2 | Chemokine ligand 2 |
| Cl⁻ | Ion chlorure |
| COX-2 | Cyclooxygénase 2 |
| CV | Coefficient de variation |
| EDTA | Acide éthylènediaminetétraacétique |
| ELISA | Dosage d'immunoabsorption enzymatique, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FISH | Hybridation In Situ Fluorescente, <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> |
| H₂O₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| HOCl | Acide hypochloreux |
| HOSCN | Acide hypothiocyanique |
| hrMPO | Myéloperoxydase humaine recombinante, <i>human recombinant Myeloperoxidase</i> |
| HRP | Peroxydase de Raifort, <i>Horse Radish Peroxidase</i> |
| IgA | Immunoglobuline A |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IRS | Score d'immunoréactivité, <i>Immunoreactive Score</i> |
| LPS | Lipopolysaccharides |
| MPO | Myéloperoxydase |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NaOH | Hydroxyde de sodium |
| NET | <i>Neutrophil Extracellular Trap</i> |
| PAMP | Motif moléculaire associé aux pathogènes, <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> |
| PBS | Tampon phosphate salin, <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |
| PGF2α | Prostaglandines F2 α |
| PRR | Récepteur de reconnaissance des motifs moléculaires, <i>Pattern Recognition Receptor</i> |
| R_A | Rapport MPO active/protéines totales |
| R_T | Rapport MPO totale/protéines totales |

| | |
|------------------------|--|
| RT-qPCR | Réaction en chaîne par polymérase quantitative après transcription inverse, <i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| SCN⁻ | Thiocyanate |
| SD | Écart-type, <i>standard deviation</i> |
| SIEFED | Immuno-extraction spécifique suivie d'un test de détection enzymatique, <i>Specific Immunologic Extraction Followed by Enzymatic Detection</i> |
| sIgA | Immunoglobuline A sécrétoire |
| TLR | Récepteur de type Toll, <i>Toll-like Receptor</i> |
| TNF-α | Facteur de nécrose tumorale-alpha, <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> |

Table de matières

| | |
|---|-----------|
| Résumé - Abstract..... | 1 |
| Préambule général | 7 |
| Introduction | 11 |
| 1. Physiologie de la reproduction chez la jument..... | 13 |
| 1.1. Saisonnalité..... | 13 |
| 1.2. Le cycle œstral..... | 13 |
| 1.3. Anœstrus saisonnier | 15 |
| 2. Anatomie fonctionnelle de l'appareil reproducteur chez la jument..... | 16 |
| 2.1. Changements cycliques du tractus génital..... | 18 |
| 2.1.1. Œstrus | 18 |
| 2.1.2. Diœstrus | 18 |
| 2.2. Focus sur l'utérus | 20 |
| 2.2.1. L'endomètre | 21 |
| 2.2.2. Changements cycliques de l'endomètre | 22 |
| 3. Défense utérine | 25 |
| 3.1. Challenge immunitaire..... | 26 |
| 3.2. Résilience..... | 28 |
| 3.2.1. Évitement..... | 29 |
| 3.2.2. Tolérance..... | 30 |
| 3.2.3. Résistance | 35 |
| 3.3. Cellules immunitaires dans l'endomètre | 35 |
| 4. Endométrite | 37 |
| 4.1. Endométrite de post-saillie | 38 |
| 4.2. Endométrite persistante de post-saillie | 43 |
| 4.3. Enjeux sur la fertilité | 44 |
| 4.4. Causes | 45 |
| 4.4.1. Âge de la jument | 45 |
| 4.4.2. Contaminations utérines..... | 46 |
| 4.4.3. Diminution ou retardement de la clearance utérine mécanique | 46 |
| 4.4.4. Réponse inflammatoire altérée..... | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5. Diagnostic | 49 |
| 5. Myéloperoxydase | 53 |
| Objectifs de la recherche | 59 |
| Présentation d'études | 65 |
| Étude 1 : Des concentrations élevées de myéloperoxydase utérine comme indicateur d'endométrite chez la jument | 67 |
| 1.1 Introduction | 69 |
| 1.2 Matériel et Méthodes | 69 |
| 1.2.1 Juments et prélèvements | 69 |
| 1.2.2 Liquide intraluminal et grade d'œdème | 70 |
| 1.2.3 Cytologie | 70 |
| 1.2.4 Dosage de la myéloperoxidase | 71 |
| 1.2.5 Analyses statistiques..... | 72 |
| 1.3 Résultats | 72 |
| 1.3.1 Hyperœdème, liquide intraluminal et cytologie | 72 |
| 1.3.2 Concentration en myéloperoxidase | 73 |
| 1.3.3 Gestation | 74 |
| 1.4 Discussion..... | 74 |
| 1.5 Conclusion | 77 |
| Étude 2 : Caractérisation de la myéloperoxydase dans l'endomètre équin sain..... | 79 |
| 2.1 Introduction | 81 |
| 2.2 Matériel et Méthodes | 81 |
| 2.2.1 Animaux et collecte d'échantillons..... | 81 |
| 2.2.2 Histologie | 82 |
| 2.2.3 Dosage de la myéloperoxidase totale..... | 83 |
| 2.2.4 Dosage de la myéloperoxidase active | 83 |
| 2.2.5 Dosage des protéines totales | 83 |
| 2.2.6 Immunohistochimie | 83 |
| 2.2.7 Évaluation semi-quantitative du profil immunohistochimique de la myéloperoxydase | 84 |
| 2.2.8 Analyses statistiques..... | 85 |
| 2.3 Résultats | 85 |

| | |
|---|------------|
| 2.3.1 Évaluation histologique | 85 |
| 2.3.2 Myéloperoxidase | 86 |
| 2.3.3 Concentration en protéines totales | 86 |
| 2.3.4 Rapport myéloperoxydase totale/protéines totales (R_T) | 87 |
| 2.3.5 Rapport myéloperoxydase active/protéines totales (R_A) | 88 |
| 2.3.6 Activité spécifique de la myéloperoxydase | 88 |
| 2.3.7 Immunohistochimie | 89 |
| 2.4 Discussion | 94 |
| 2.5 Conclusion | 100 |
| Étude 3 : Évaluation immunohistochimique de la myéloperoxydase dans l'endomètre équin atteint d'endométriose | 101 |
| 3.1 Introduction | 103 |
| 3.2 Matériel et Méthodes | 104 |
| 3.3 Résultats | 104 |
| 3.4 Discussion | 105 |
| 3.5 Conclusion | 106 |
| Discussion générale | 107 |
| 1. MPO comme possible biomarqueur d'endométrite | 109 |
| 2. MPO dans l'utérus de la jument en conditions physiologiques | 110 |
| 2.1. MPO utérine | 110 |
| 2.2. Origine de la MPO Utérine | 111 |
| 2.3. Rôle de la MPO utérine dans les mécanismes de défense de l'utérus | 116 |
| 2.4. Variabilité de la concentration de la MPO utérine | 118 |
| 2.5. Activité enzymatique de la MPO utérine | 119 |
| 3. MPO dans des situations pathologiques utérines | 121 |
| Conclusions | 123 |
| Perspectives | 125 |
| Bibliographie | 127 |
| Annexes : Études scientifiques | 153 |

Résumé - Abstract

Résumé

L'endométrite est une cause majeure d'infertilité chez la jument et le troisième problème médical le plus courant chez le cheval adulte. Le signe pathognomonique de l'endométrite est la présence de neutrophiles dans la lumière utérine et/ou le tissu endométrial. La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme pro-oxydante, contenue et libérée par les neutrophiles, qui possède une action microbicide puissante. Elle est considérée comme un marqueur de leur activation et donc de l'inflammation, et elle a déjà été utilisée comme biomarqueur pour diverses affections inflammatoires chez le cheval dans différents liquides biologiques et tissus. Cependant, la présence de MPO n'avait jamais été étudiée dans l'utérus chez la jument.

Dès lors, nous avons décidé d'étudier la présence potentielle de MPO dans le liquide des lavages utérins chez la jument en œstrus, et d'évaluer la relation entre sa concentration, mesurée par ELISA, et la présence de neutrophiles dans la lumière utérine. Nous avons découvert que la MPO était présente, à des concentrations très variables, dans la lumière utérine de toutes les juments échantillonnées, et que celles atteintes d'endométrite avaient des concentrations en MPO plus élevées que les juments présentant une cytologie négative. Nos résultats ont donc relevé que la concentration de MPO dans le liquide des lavages utérins chez la jument en œstrus pouvait être un biomarqueur potentiel pour le diagnostic de l'endométrite. Néanmoins, sa détection en absence d'inflammation suggérait une présence physiologique de la MPO dans l'utérus de la jument.

Dans notre deuxième étude, nous avons mesuré les concentrations en MPO dans le liquide de lavages utérins chez des juments saines en œstrus, en diœstrus et en anœstrus, afin de confirmer/infirmer la présence physiologique de la MPO dans la lumière utérine et explorer sa potentielle dynamique au cours du cycle reproducteur. Nous avons décidé de déterminer également son activité enzymatique, mesurée par SIEFED, pour mieux la caractériser. Nous avons choisi d'utiliser la biopsie utérine pour confirmer l'absence d'inflammation, puisque cette méthode est considérée comme le « Gold Standard » pour le diagnostic d'endométrite chez la jument. La MPO était présente dans tous les liquides de lavages utérins analysés à l'exception d'un échantillon prélevé en diœstrus et d'un autre en anœstrus. Ces résultats ont démontré l'existence d'une présence intrinsèque de MPO dans l'utérus de la jument, non obligatoirement liée à l'inflammation. Cependant, la plupart de la MPO détectée était enzymatiquement inactive.

Dans le cadre de ce même protocole, les biopsies utérines prélevées durant les différentes phases du cycle reproducteur, initialement réalisées pour confirmer l'absence d'inflammation, ont également été exploitées afin de déterminer l'origine de cette MPO utérine. Des colorations immunohistochimiques ont été réalisées sur ces prélèvements. Nous avons découvert que les cellules épithéliales des glandes endométriales pourraient être à l'origine de la MPO utérine non associée à l'inflammation et que la présence de cette MPO dans l'utérus de la jument n'était pas constitutive, mais plutôt cyclique, avec une présence maximale en œstrus, qui diminue en diœstrus et est absente en anœstrus.

Enfin, nous avons réalisé une dernière étude sur les biopsies des juments en œstrus présentant de la fibrose endométriale afin de mieux comprendre l'impact de cette affection sur la présence de la MPO dans l'endomètre. L'immunohistochimie réalisée sur ces prélèvements a montré que le marquage de la MPO dans les cellules des glandes affectées par la fibrose était absent ou diminué par rapport aux glandes saines. La présence de la MPO pouvait donc être diminuée chez les juments atteintes de fibrose endométriale.

En conclusion, au cours de notre travail, nous avons pu mettre en exergue la présence constante de MPO, majoritairement inactive, dans l'utérus de la jument tout au long du cycle reproducteur et indépendamment de l'inflammation. Nous avons également mis en évidence que cette MPO, lors du cycle œstral, est intrinsèque à l'utérus et nos résultats suggèrent que les cellules endométriales des glandes pourraient l'exprimer pendant l'œstrus. Vu son action comme puissant microbicide dans l'immunité innée, il est très probable que la MPO joue un rôle protecteur dans cette phase du cycle comme partie intégrante des mécanismes de tolérance de l'utérus. En outre, nous avons montré que la fibrose endométriale diminue la présence de la MPO, ce qui pourrait avoir un impact dans la protection de l'utérus. Enfin, nos études ont montré que la concentration en MPO augmente dans l'utérus des juments en cas d'inflammation. Cependant, plusieurs questions doivent encore être élucidées concernant la MPO utérine et son rôle potentiel dans le système immunitaire de la muqueuse endométriale.

Abstract

Endometritis is a major cause of infertility in mares and ranks as the third most common medical problem in adult horses. The hallmark of endometritis is the presence of neutrophils within the uterine lumen and/or endometrial tissue. Myeloperoxidase (MPO), a pro-oxidant enzyme contained and released by neutrophils, exhibits potent microbicidal activity and is considered as a marker of neutrophil activation, and thus, inflammation. MPO has already been utilized as a biomarker for various inflammatory conditions in horses across different biological fluids and tissues. However, its presence in the mare's uterus had not yet been investigated.

Consequently, we decided to investigate the potential presence of MPO in the uterine lavage fluid from estrous mares and to evaluate the relationship between its concentration, measured by ELISA, and neutrophil presence in the uterine lumen. Our findings revealed that MPO was detectable in all mares sampled, with concentrations varying widely. Mares with endometritis exhibited higher MPO concentrations compared to those with negative cytology. These results suggested that the MPO concentration may serve as a potential biomarker for diagnosing endometritis. However, its detection in the absence of inflammation indicated a possible physiological presence of MPO in the mare's uterus.

In our second study, we measured MPO concentrations in uterine lavage fluid from healthy mares during estrus, diestrus, and anestrus to confirm the physiological presence of MPO in the uterine lumen and investigate its potential dynamics throughout the reproductive cycle. Enzymatic activity of MPO was also assessed using SIEFED for further characterization. To confirm the absence of inflammation, uterine biopsies -considered as the 'Gold Standard' for diagnosing endometritis -were performed. MPO was detected in all lavage samples except one from diestrus and one from anestrus. These results indicated an intrinsic presence of MPO in the mare's uterus, not necessarily related to inflammation. However, most of the detected MPO was found to be enzymatically inactive.

As part of this same protocol, uterine biopsies from different phases of the reproductive cycle, initially collected to confirm the absence of inflammation, were also used to determine the origin of uterine MPO.

Immunohistochemical staining revealed that the epithelial cells of the endometrial glands were the probable source of non-inflammatory MPO, and that its presence in the uterus was cyclical, with maximal detection during estrus, decreasing in diestrus, and absent in anestrus.

Abstract

Furthermore, we investigated the impact of endometrial fibrosis on MPO immunohistochemical detection by analyzing biopsies from mares in estrus affected by this condition. Immunohistochemical staining showed that the presence of MPO in glands affected by fibrosis was either absent or significantly reduced compared to healthy glands, suggesting that endometrial fibrosis may impair MPO presence.

In conclusion, our work highlighted the constant presence of MPO, mostly inactive, in the mare's uterus throughout the reproductive cycle, independent of inflammation. We demonstrated that this MPO is intrinsic to the uterus, and our results suggest that it is expressed by endometrial gland cells during estrus. Given its potent microbicidal action in innate immunity, MPO likely plays a protective role during this phase of the cycle as part of the uterine tolerance mechanisms. Furthermore, we found that endometrial fibrosis reduces MPO presence, which may compromise uterine protection. Lastly, our studies indicated that MPO concentration increases in the uterus of mares during inflammation. However, additional investigations are needed regarding uterine MPO and its potential role in the uterine mucosal immune system.

Préambule général

Dans le domaine de la reproduction équine, l'endométrite est l'une des affections les plus fréquemment rencontrées sur le terrain (Traub-Dargatz *et al.*, 1991), avec un impact majeur sur la fertilité des juments (Troedsson, 1999). Elle entraîne une baisse du taux de gestation et engendre des procédures diagnostiques et thérapeutiques coûteuses pour les propriétaires, nécessitant la mobilisation de ressources vétérinaires et, bien souvent, la répétition des saillies. D'un point de vue physiologique, l'endométrite est une réponse inflammatoire de l'utérus consécutive à la saillie, ou à tout autre type de contamination utérine. Cette réaction constitue un mécanisme de défense essentiel visant à restaurer rapidement un environnement utérin compatible avec une éventuelle gestation. Toutefois, cette inflammation n'est considérée comme physiologique que si elle se résout dans les 24 - 36 h suivant l'agression (LeBlanc *et al.*, 1994, Katila, 1995). Au-delà de ce délai, elle devient pathologique et compromet la fertilité.

Cette affection représente un véritable défi pour le vétérinaire, car il n'existe pas de traitement unique, mais plutôt une prise en charge individualisée, reposant sur différentes approches thérapeutiques adaptées au contexte clinique et à la réponse utérine de chaque jument. Toutefois, l'efficacité du traitement repose avant tout sur un diagnostic fiable et précoce. Or, malgré plus d'un demi-siècle de recherches ayant conduit à des progrès notables dans sa prise en charge (Knudsen, 1964), l'endométrite reste encore trop souvent sous-diagnostiquée ou le diagnostic est posé trop tardivement pour permettre une prise en charge optimale.

Dans ce contexte, l'identification de nouveaux outils diagnostiques s'avère essentielle. Dans le domaine de la reproduction équine, un intérêt croissant se porte sur la recherche de biomarqueurs inflammatoires pouvant servir d'indicateurs fiables de l'endométrite. Leur exploration ne se limite pas uniquement à l'amélioration du diagnostic, mais contribue également à une meilleure compréhension des mécanismes et processus sous-jacents à cette affection, ce qui est fondamental pour optimiser la prise en charge des juments et améliorer leur taux de gestation.

Dans cette perspective, nous avons choisi d'étudier la myéloperoxydase (MPO), considérée comme un marqueur de l'activation des neutrophiles, dans le liquide des lavages utérins chez la jument, avec l'objectif de développer une méthode diagnostique facilement réalisable sur le terrain.

Cette dernière permettrait non seulement de détecter les juments souffrant d'endométrite subclinique, mais aussi d'identifier celles présentant une prédisposition à développer cette affection.

Cette thèse suit une chronologie particulière, justifiée par les résultats obtenus. La recherche, initialement clinique, a progressivement laissé place à des investigations plus fondamentales, et l'introduction qui suit en témoigne. Avant d'aborder les différentes études originales constituant ce travail et après un bref rappel sur la physiologie et l'anatomie de la reproduction chez la jument – destiné aux non spécialistes -, cette introduction vise à dresser l'état des connaissances scientifiques sur le système de défense utérin, les défis auxquels il est confronté et les mécanismes impliqués dans le maintien de son homéostasie. L'endométrite chez la jument sera ensuite abordée, avec un effort particulier pour rendre accessible un sujet complexe tant du point de vue de la réponse physiologique que pathologique, en présentant les facteurs de risque, les effets sur la fertilité et les méthodes diagnostiques. Enfin, le dernier chapitre sera consacré à la MPO, non pas sous un angle biochimique, mais dans une perspective physiologique et physiopathologique.

Ce travail de thèse soulève plus de questions qu'il n'apporte de réponses, mais ces interrogations ouvrent des perspectives stimulantes pour de nouvelles recherches. Ainsi, la discussion générale propose une réflexion sur les hypothèses susceptibles d'y répondre et esquisse des pistes d'investigation pour approfondir les questionnements soulevés par nos résultats, afin d'améliorer à terme, la compréhension du système immunitaire de la muqueuse endométriale et les mécanismes impliqués dans l'endométrite chez la jument.

Bonne lecture !

Introduction

1. PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LA JUMENT

1.1 Saisonnalité

La jument est une espèce polyœstrienne saisonnière à luminosité croissante. Des facteurs tels que l'âge, le score corporel, la disponibilité alimentaire et la température ambiante peuvent influencer son activité reproductive. Cependant, la saisonnalité est principalement régulée par les variations de la photopériode (Palmer *et al.*, 1982). Lorsque la durée des jours raccourcit, l'activité ovarienne diminue significativement, entraînant une phase d'anœstrus saisonnier, ou période de quiescence sexuelle. À l'inverse, l'allongement des journées induit le retour à la cyclicité. Ainsi, en conditions naturelles, la saison de reproduction a lieu au printemps et en été (d'avril à septembre dans l'hémisphère Nord (Hughes *et al.*, 1975)).

1.2 Le cycle œstral

Chez la jument, le cycle œstral est défini comme l'intervalle entre deux ovulations (Figure 1). Cet intervalle interovulatoire a une durée moyenne de 21 - 22 jours (Brinsko *et al.*, 2011a). Cependant, il peut fluctuer de manière physiologique chez une même jument dans un intervalle allant de 18 à 24 jours au cours de la saison de reproduction (Brinsko *et al.*, 2011a).

D'un point de vue physiologique, le cycle œstral est divisé en deux phases : la phase folliculaire et la phase lutéale. Toutefois, en pratique clinique et sur le terrain, la distinction repose souvent sur une base comportementale, différenciant l'œstrus, période de réceptivité sexuelle, du diœstrus, période de non-réceptivité. L'œstrus coïncide principalement avec le développement et la maturation des follicules, correspondant ainsi à la phase folliculaire, qui s'étend de la lutéolyse jusqu'à l'ovulation suivante (Ginther, 1992). En revanche, le diœstrus survient durant la phase lutéale, caractérisée par la présence du corps jaune ou *corpus luteum* (Ginther, 1992).

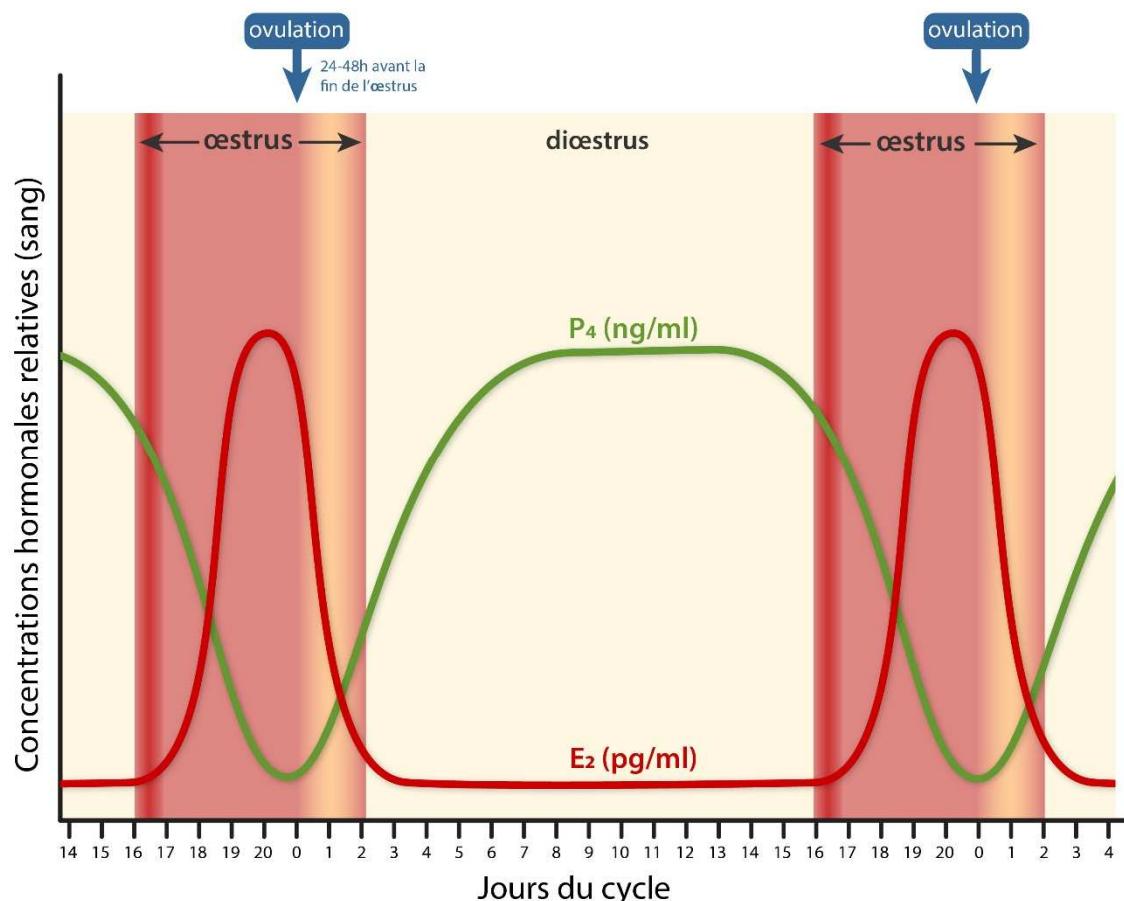


Figure 1. Variations des concentrations relatives en œstradiol (E_2) et en progestérone (P_4) au cours du cycle œstral chez la jument. Les phases de proœstrus et de métœstrus sont incluses dans l'œstrus. Source : auteur.

Ces deux nomenclatures seront utilisées de manière interchangeable dans ce manuscrit. Les phases de proœstrus et de métœstrus sont bien présentes dans le cycle de la jument, mais elles sont indistinguables de l'œstrus, et par conséquent, incluses dans ce dernier (Figure 1).

Pendant la phase folliculaire, les follicules synthétisent des œstrogènes, plus précisément du 17- β -œstradiol qui devient l'hormone prédominante durant l'œstrus. Les concentrations d'œstrogènes commencent à augmenter environ 6 jours avant l'ovulation et marquent ainsi le début de l'œstrus (Makawiti *et al.*, 1983). Le pic d'œstrogènes est atteint 48 h avant l'ovulation (Makawiti *et al.*, 1983), suivi d'une diminution progressive dans les 24 à 48 h post-ovulation (Daels *et al.*, 1991).

La phase folliculaire se termine par l'ovulation, marquée par la libération de l'ovocyte fécondable et la transformation du follicule dominant en corps jaune, structure responsable de la production de progestérone, hormone prédominante lors de la phase lutéale.

Chez la jument, les concentrations sanguines de progestérone augmentent immédiatement avec l'ovulation (Costa *et al.*, 2005). Cette augmentation se poursuit progressivement pour atteindre son pic maximal vers le 8^{ème} jour post-ovulation, avant de diminuer lentement jusqu'au jour 14 du cycle, début de la lutéolyse (Ginther *et al.*, 2007), ce qui provoque la chute de la progestéronémie, permettant ainsi l'initiation d'un nouveau cycle oestral (Evans *et al.*, 2007).

La durée de l'œstrus chez la jument est particulièrement variable et relativement longue comparée à d'autres espèces domestiques. En moyenne, l'œstrus dure entre 5 et 7 jours dépendant du moment au sein de la saison de reproduction, avec un intervalle moyen de 4,5 à 8,9 jours (Ginther, 1992) selon les études. En revanche, la durée du diœstrus est beaucoup plus stable, oscillant entre 14 et 15 jours (Aurich, 2011).

1.3 Anœstrus saisonnier

Avec l'allongement de la durée des heures sombres, l'activité ovarienne diminue de manière significative, plongeant la jument dans une phase d'anœstrus saisonnier. Cette période est caractérisée par une incompétence reproductive totale. Cependant, des vagues folliculaires peuvent survenir, avec des follicules qui entament leur développement mais qui finissent par subir une atrésie (Donadeu et Ginther, 2002). Par conséquent, cette activité folliculaire ne mène pas à la formation de tissu lutéal, entraînant des concentrations plasmatiques de progestérone indétectables (Parrilla Hernández *et al.*, 2016). Les concentrations d'œstrogènes durant l'anœstrus restent basses, avec des fluctuations qui ne semblent pas être associées aux vagues folliculaires (Donadeu et Ginther, 2002).

2. ANATOMIE FONCTIONNELLE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR CHEZ LA JUMENT

L'appareil reproducteur de la jument se compose d'un utérus, formé par deux cornes utérines qui convergent pour former le corps utérin (Figure 2).

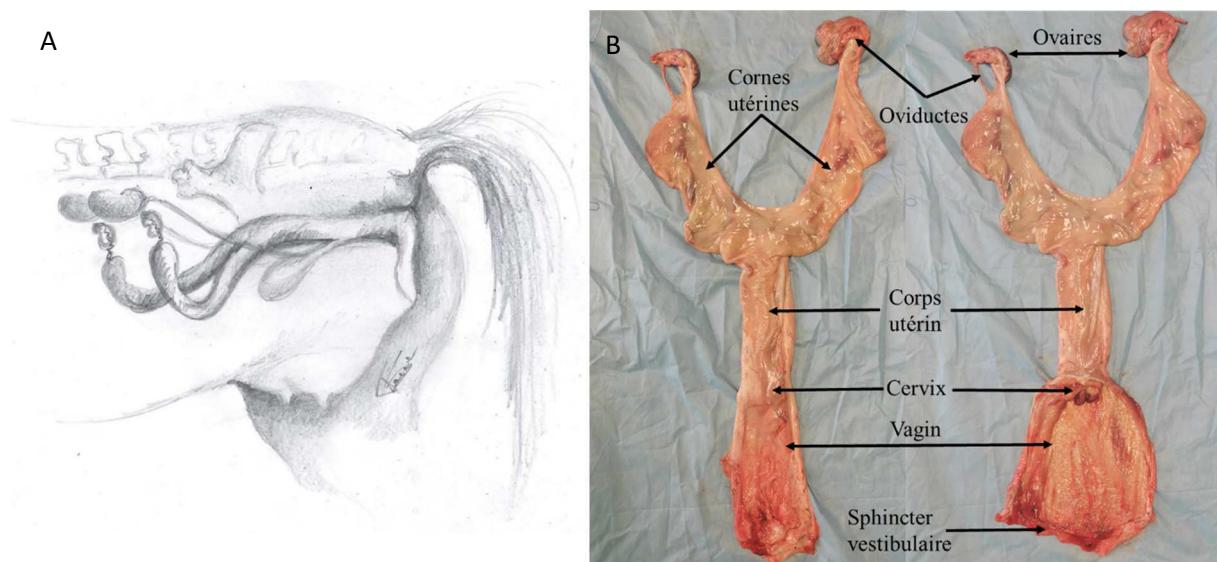


Figure 2. Vue latérale (A) et dorsale (B) du tractus génital de la jument. Dans l'image B, la paroi dorsale du vagin a été ouverte (à droite) pour montrer la muqueuse vaginale, le cervix et le sphincter vestibulaire. Source : auteur.

Crânialement, les cornes utérines se prolongent par les oviductes, qui sont en étroite association fonctionnelle avec les ovaires. En direction caudale, le cervix ou col de l'utérus assure la transition entre le corps de l'utérus et le vagin, lequel s'étend vers l'extérieur via la vulve (Figure 3). La vulve est subdivisée en différentes structures, à savoir le vestibule, les lèvres vulvaires et le clitoris. Le sphincter vestibulaire (Figure 4), constitué d'un repli transversal ou sphincter, est localisé entre le vagin caudal et la vulve, et constitue la limite anatomique entre les parties crâniale et caudale du système reproducteur chez la jument (Evans *et al.*, 2007).

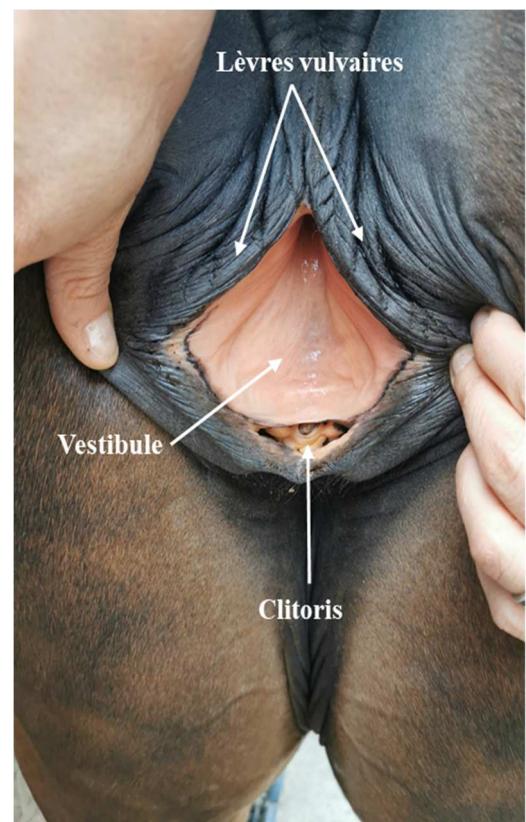


Figure 3. Vulve de la jument. Les lèvres vulvaires ont été écartées (image de droite) afin de visualiser le clitoris et le vestibule. Source : auteur.

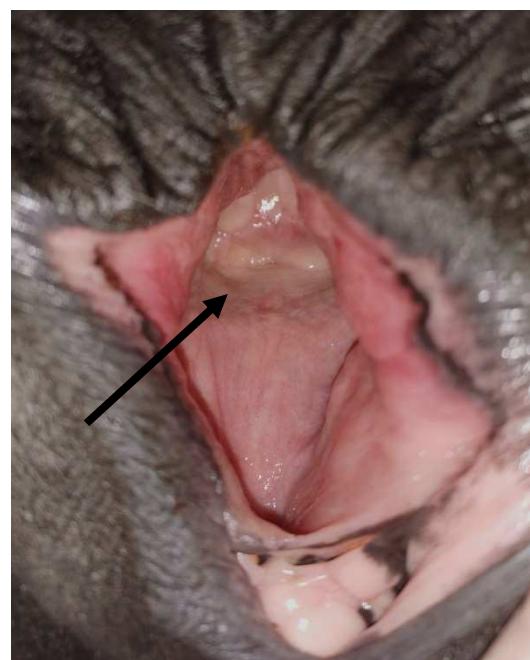


Figure 4. Sphincter vestibulaire de la jument. Source : auteur.

2.1 Changements cycliques du tractus génital

Les organes reproducteurs sont des structures dynamiques, tant sur le plan physiologique que morphologique. Leur fonctionnement est dépendant des hormones stéroïdiennes et des interactions avec leurs récepteurs. Ainsi, la morphologie des différents composants du tractus génital varie en réponse aux fluctuations endocriniennes, s'adaptant aux fonctions qui leur sont propres selon la phase du cycle œstral ou en fonction du statut reproducteur.

2.1.1 œstrus

Pendant l'œstrus, la prédominance des œstrogènes sur la progestérone contribue à faciliter la saillie et permet le passage des spermatozoïdes à travers l'utérus jusqu'aux oviductes, où a lieu la fécondation de l'ovocyte. Le tonus musculaire du tractus génital diminue, entraînant une relaxation de l'utérus et du vagin. Les lèvres vulvaires se relâchent également, permettant la pénétration du pénis lors de la saillie (Paccamonti et Pycock, 2009). Sous imprégnation œstrogénique, le col utérin se congestionne et se relâche (Figure 5). Contrairement à la plupart d'autres espèces domestiques, dont le cervix est doté d'anneaux transversaux interdigités limitant l'ouverture cervicale malgré la relaxation musculaire, les replis longitudinaux du cervix de la jument permettent son ouverture pendant l'œstrus (Senger, 2012). Bien que le pénis soit dans le vagin au moment de l'éjaculation, le sperme est généralement déposé directement dans l'utérus (Katila, 2011). Pendant l'œstrus, la sécrétion de mucus cervical augmente en quantité et devient plus fluide, agissant comme un lubrifiant (Katila, 2012). Seul le sphincter vestibulaire reste fonctionnellement fermé durant cette phase, assurant une séparation physique entre l'utérus et l'environnement extérieur (Hinrichs *et al.*, 1988).

2.1.2 Diœstrus

Au cours de la phase lutéale, le tractus génital se prépare pour accueillir, nourrir et permettre le développement d'un éventuel embryon dès son arrivée dans l'utérus 6 - 6,5 jours après l'ovulation (Battut *et al.*, 1997). Le tonus musculaire de l'utérus, du vagin et de la vulve augmente, permettant à cette dernière de rester fermée. La prédominance de la progestérone sur les œstrogènes entraîne également la fermeture du col utérin (Figure 5). Pendant cette phase, la production de mucus cervical est modifiée, il devient plus épais et visqueux, et encore davantage lors de la gestation, contribuant ainsi à sceller le canal cervical (Katila, 2012).

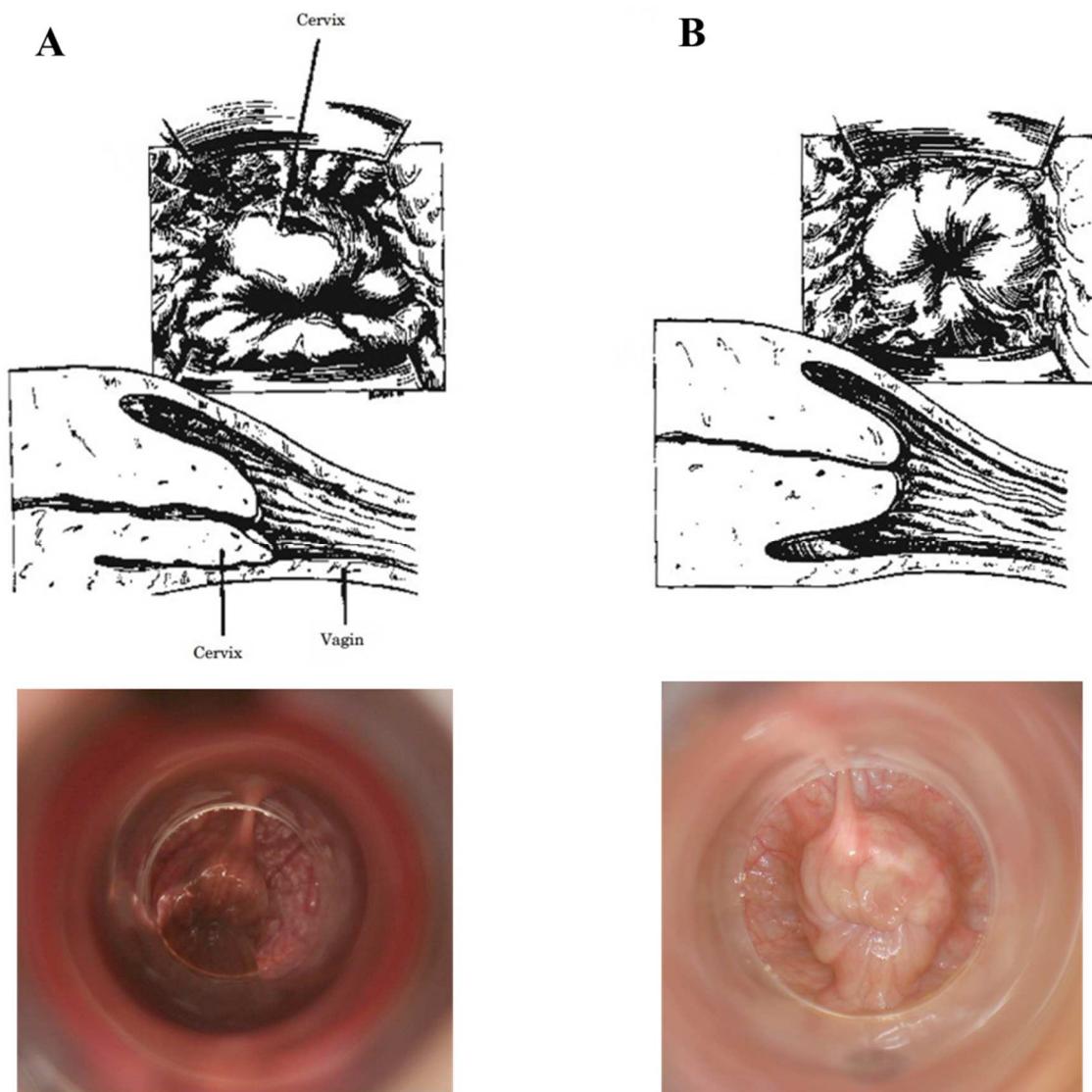


Figure 5. Représentation (partie supérieure de l'image - (Kainer, 2011)) et image à travers un speculum vaginal (partie inférieure de l'image – Source : auteur) de la partie vaginale du cervix de la jument sous imprégnation œstrogénique (A) et sous imprégnation progestéronique (B).

2.2 Focus sur l'utérus

L'utérus constitue, avec le reste du tractus génital et à l'exception des ovaires, un système de tubulures interconnectées. Il est composé de plusieurs couches concentriques (Figure 6) :

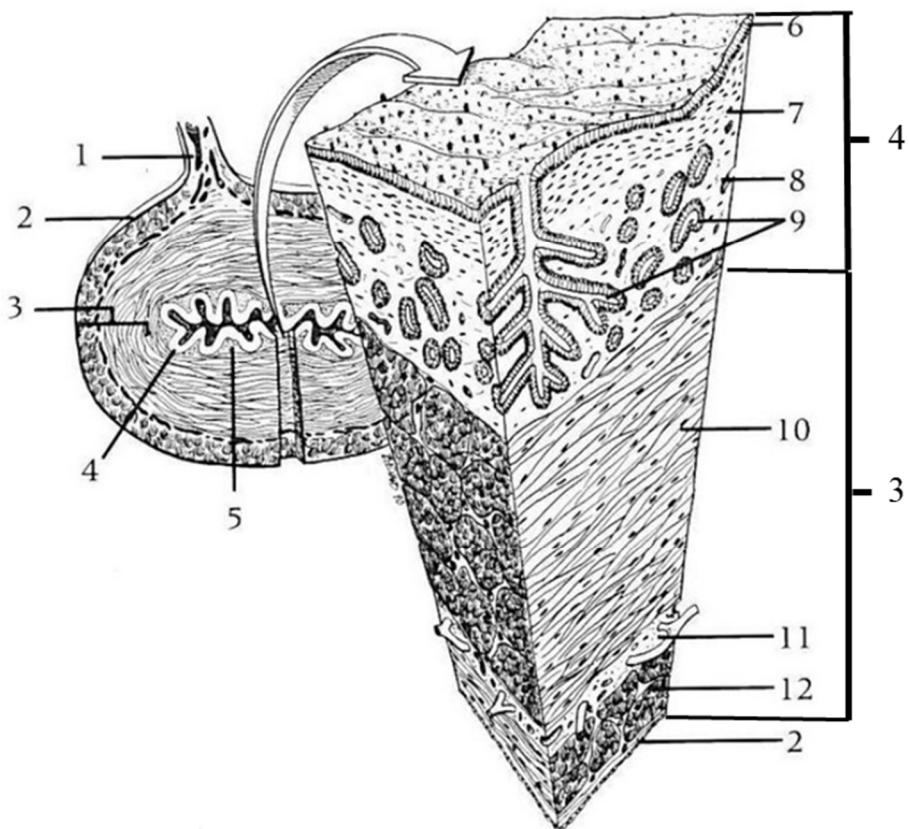


Figure 6. Représentation d'une coupe transversale de la corne utérine chez la jument. (1) Mésomètre ; (2) Périmètre ; (3) Myomètre ; (4) Endomètre ; (5) Stroma endométrial ; (6) Épithélium luminal ; (7) *Stratum Compactum* ; (8) *Stratum Spongiosum* ; (9) Glandes endométriales ; (10) Couche interne circulaire du myomètre ; (11) Couche vasculaire du myomètre ; (12) Couche externe longitudinale du myomètre (D'après (Doig et Waelchli, 1993) - modifiée).

La *séreuse* constitue la couche la plus externe, composée d'un tissu conjonctif lâche bordé par un *mésothélium*.

La *musculeuse* ou *myomètre*, est située au milieu et est formée de deux couches de musculature lisse : une couche externe longitudinale et une couche interne circulaire, séparées par une couche vasculaire. Le myomètre est responsable des contractions utérines, facilitant le transport des produits de sécrétion, des spermatozoïdes, la mobilité embryonnaire, ainsi que le drainage et l'expulsion du fœtus lors de la mise-bas.

La *muqueuse* utérine ou *endomètre* constitue la couche la plus interne de l'utérus. Elle est formée par un *épithélium* de revêtement reposant sur un *chorion* très cellulaire, qui abrite les nerfs ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques. L'*épithélium endométrial* est en alignment direct avec la lumière utérine et c'est donc la surface de contact avec les gamètes et l'*embryon/fœtus* (Senger, 2012). La lumière de l'utérus est pratiquement oblitérée par de grands plis longitudinaux de l'*endomètre* (12 à 15) ne laissant que des espaces capillaires entre eux (Kainer, 2011).

2.2.1 L'*endomètre*

L'*endomètre* chez la jument est constitué de l'*épithélium luminal* et de la *lamina propria* qui s'étend de la membrane basale de l'*épithélium* jusqu'à la couche circulaire du *myomètre* (Figure 7). L'*épithélium* est de type cubique à cylindrique. Il comprend des *épithéliocytes ciliés* et non ciliés glandulaires, ces derniers contenant des vésicules de type sécrétoire dans la zone apicale supranucléaire (Tunón *et al.*, 1995).

La *lamina propria* est constituée de tissu conjonctif de soutien et abrite de nombreuses glandes endométriales qui s'ouvrent dans la lumière de l'utérus, s'étendent et se ramifient en profondeur. L'*épithélium glandulaire* est similaire à l'*épithélium* de la surface, à l'exception des cellules de type sécrétoire. Dans la partie droite des glandes, les cellules non ciliées sont dépourvues de vésicules sécrétoires tandis que dans les parties moyennes et profondes, l'activité sécrétoire est très importante (Tunón *et al.*, 1995). La *lamina propria* peut être divisée en deux parties distinctes :

Le *stratum compactum* : composé de tissu conjonctif avec une forte densité des cellules stromales, contenant des capillaires sous-épithéliaux ainsi que les parties droites des glandes ou canaux glandulaires.

Le *stratum spongiosum* : formé d'un tissu moins dense, renfermant les vaisseaux (sanguins et lymphatiques), les nerfs, ainsi que les parties ramifiées et contournées des glandes endométriales, divisées à des fins descriptives en glandes moyennes et profondes (Kenney, 1978).

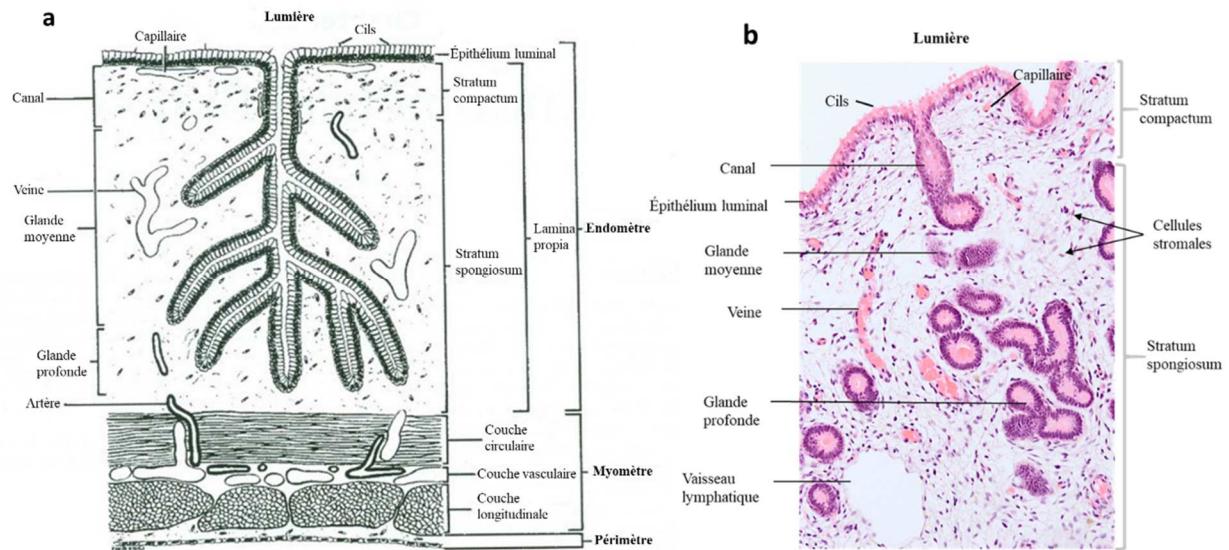


Figure 7. (a) Schéma histologique de l'utérus chez la jument (D'après Kenney, 1978 - modifié). (b) Image histologique de la structure de l'endomètre de la jument colorée à l'hématoxyline & à l'éosine. Grossissement 100x. Source : auteur.

2.2.2 Changements cycliques de l'endomètre

Pendant la saison de reproduction, l'endomètre évolue progressivement avec l'avancement du cycle (Figure 8). En œstrus (Figure 8a,d), les cellules épithéliales, caractérisées par un noyau ovoïde à allongé, deviennent cylindriques hautes et l'endomètre peut, à certains endroits, devenir pseudo-stratifié. Sous l'influence des œstrogènes, la *lamina propria* est fortement œdématisée, donnant aux glandes l'apparence d'être dispersées, peu tortueuses et avec une lumière très étroite. Cet œdème, plus manifeste dans le *stratum compactum*, est souvent associé à une accumulation variable de liquide dans la lumière utérine (Tunón *et al.*, 1995).

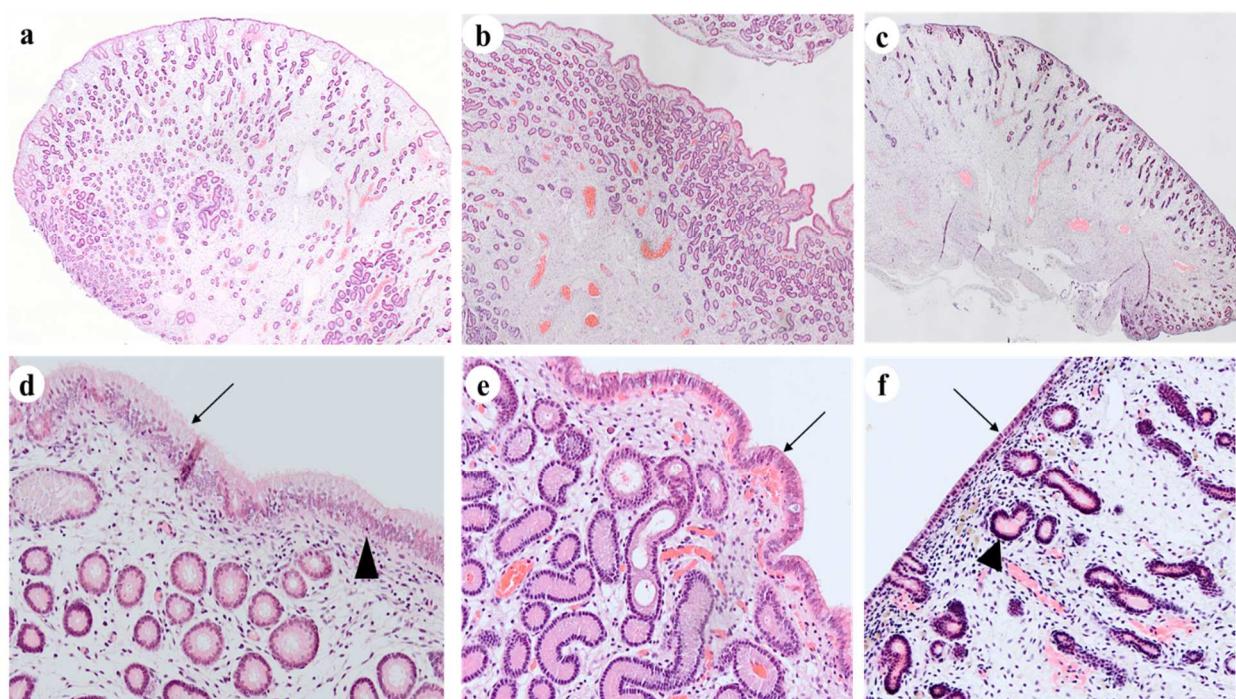


Figure 8. Particularités histologiques de l'endomètre équin coloré à l'hématoxyline & à l'éosine. **(a, d) Cœstrus :** La *lamina propria* est œdématisée. **(a)** Les glandes sont étroites et dispersées. Grossissement 20x. **(d)** Les cellules épithéliales sont cylindriques hautes (flèche) et l'épithélium luminal peut avoir un aspect pseudostratifié (pointe de flèche) par endroits. Grossissement 100x. **(b, e) Diœstrus :** l'endomètre ne présente pas d'œdème. **(b)** Les glandes sont tortueuses et la densité glandulaire est très élevée. Grossissement 20x. **(e)** L'épithélium luminal est cylindrique bas (flèche). Grossissement 100x. **(c,f) Anœstrus :** atrophie glandulaire. **(c)** Glandes très étroites et très dispersées. Grossissement 20x. **(f)** L'épithélium luminal est cubique (flèche) et les glandes présentent des sécrétions dans leur lumière (pointe de flèche). Grossissement 100x. Source : auteur.

Par échographie transrectale, cet œdème se manifeste par une image dite « en quartier d'orange » (Figure 9), alternant des zones échogènes (correspondant au tissu endométrial) et des zones anéchogènes (correspondant à l'œdème des replis de l'endomètre, qui apparaissent individualisés).

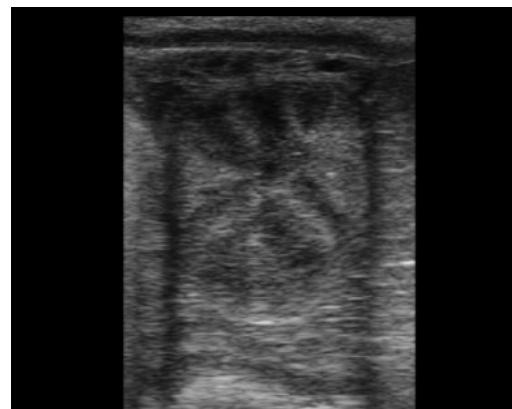


Figure 9. Image échographique d'une coupe transversale de la corne utérine chez la jument en œstrus. Source : Clinique Équine Universitaire, Université de Liège.

Le degré d'œdème suit la concentration des œstrogènes (Figure 10), atteignant son degré maximal 24 – 48 h avant l'ovulation.

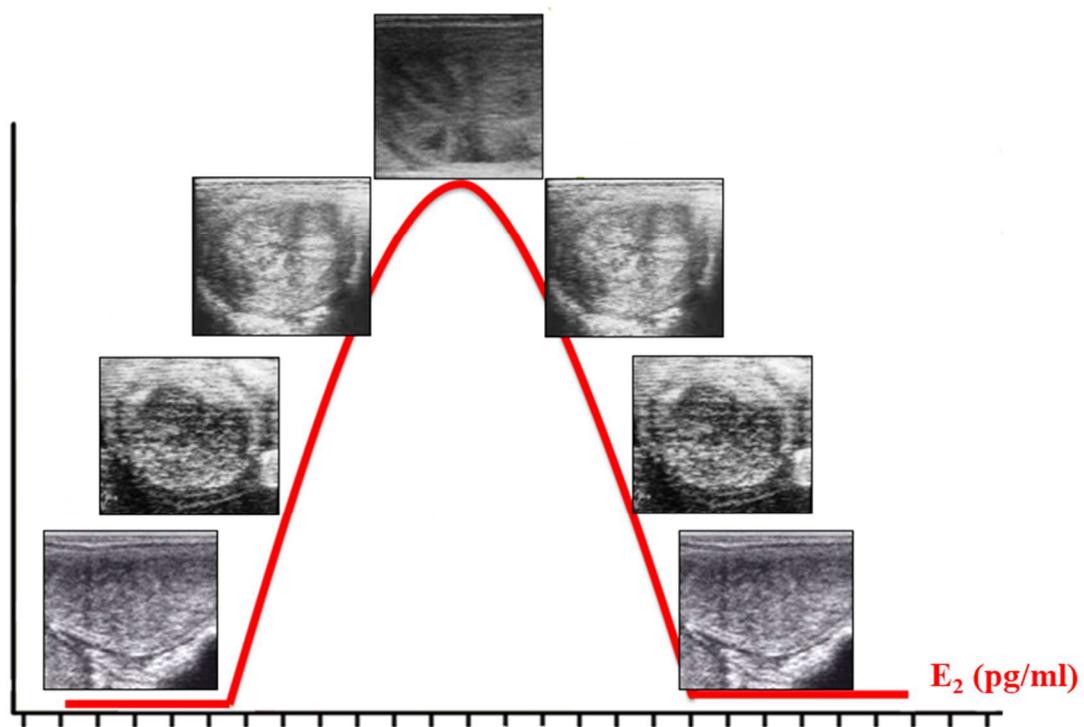


Figure 10. Évolution échographique de l'œdème endométrial lors de l'œstrus chez la jument. Source : auteur).

Pendant le diœstrus, les cellules épithéliales cylindriques diminuent de taille, et leurs noyaux deviennent ronds et basaux. L'œdème disparaît du stroma, et la densité des glandes augmente. Ces dernières deviennent plus tortueuses et leur lumière s'élargit par rapport à la phase d'œstrus (Kenney, 1978, Van Camp, 1988, Schoon *et al.*, 1992) (Figure 8b,e). À ce stade, les replis endométriaux sont moins visibles, voire inappréciables par échographie, et l'endomètre présente une échotexture plus homogène (Figure 11).



Figure 11. Image échographique d'une coupe transversale de la corne utérine chez la jument en diœstrus. Source : Clinique Équine Universitaire, Université de Liège.

3. DÉFENSE UTÉRINE

De manière similaire aux autres surfaces muqueuses de l'organisme, la défense du tractus génital de la femelle en général, et celle de l'utérus en particulier, incombe au système immunitaire des muqueuses (Wira *et al.*, 2005a). L'immunité au niveau endométrial est encore assez peu connue par rapport à celle des autres muqueuses de l'organisme, mais c'est un sujet qui fait, ces dernières années, l'objet de plus larges recherches. Étant donné que les investigations directes concernant la jument sont relativement limitées, ce chapitre fera appel aux références issues d'autres espèces. Lorsque des données spécifiques à la jument seront utilisées, elles seront clairement indiquées.

L'utérus est un lieu unique d'un point de vue immunologique. Il doit permettre le passage des spermatozoïdes et le développement d'un embryon/fœtus immunologiquement distincts, mais il doit simultanément se protéger des contaminations externes auxquelles il est continuellement exposé, sans mettre en danger la gestation.

3.1 Challenge immunitaire

L'endomètre a longtemps été considéré comme un environnement stérile, protégé des bactéries constitutivement présentes dans le vagin par le mucus cervical, notamment pendant la gestation. L'utérus était donc prétendument exposé à des contaminants seulement de manière occasionnelle, et majoritairement lors de l'accouplement et de la mise bas/accouchement. Néanmoins, cette hypothèse a été remise en question par différentes études réalisées chez la chienne (Silva *et al.*, 1995), la chatte (Chatdarong *et al.*, 2002) et la femme (Parsons *et al.*, 2002, Kunz *et al.*, 2006, Zervomanolakis *et al.*, 2007, Mitchell *et al.*, 2014), qui montrent que l'utérus est plus fréquemment exposé à des microorganismes arrivant par voie ascendante que ce qui avait été supposé auparavant.

Des particules immobiles de taille similaire à celle des spermatozoïdes se retrouvent dans l'utérus rapidement après leur placement dans le vagin crânial chez la femme, tout au long du cycle menstruel (Parsons *et al.*, 2002, Kunz *et al.*, 2006, Zervomanolakis *et al.*, 2007), bien qu'en quantités beaucoup moins importantes lors de la phase lutéale. Chez la chienne (Silva *et al.*, 1995) et la chatte (Chatdarong *et al.*, 2002), il a été observé que du milieu de contraste déposé au niveau du vagin crânial migrait immédiatement au travers du cervix ouvert pour se trouver rapidement au niveau des cornes utérines, mais ce n'était pas le cas quand le cervix était fermé. Ce type d'expérience n'a pas été réalisé chez la jument, probablement car le dépôt du sperme se fait directement dans l'utérus. Ces observations s'expliquent par le fait que l'utérus fonctionne comme une pompe péristaltique (Kunz *et al.*, 1997), capable d'aspirer du contenu vaginal dans la lumière utérine via des contractions myométriales dirigées vers les oviductes.

Cette pompe péristaltique utérine participe activement au transport rapide des spermatozoïdes (Kunz *et al.*, 1996, Zervomanolakis *et al.*, 2007). Mais par le même mécanisme, les bactéries qui se trouvent au niveau du vagin sont probablement assistées dans leur ascendance vers l'utérus. Les contractions sont plus importantes lors de la phase folliculaire, seule phase dans laquelle le transport jusqu'aux oviductes des particules déposées dans le vagin a pu être démontré (Kunz *et al.*, 1996, Zervomanolakis *et al.*, 2007). L'utérus a une activité musculaire intrinsèque mais ses contractions sont sous contrôle nerveux et hormonal, notamment au niveau local par les hormones stéroïdiennes produites par les structures ovaries. La progestérone atténue les contractions du myomètre, tandis que les œstrogènes, en absence de progestérone, les stimulent (Kunz *et al.*, 2006).

Lors de la phase lutéale chez la femme, les contractions principales ont aussi une direction cervico-tubaire, mais elles semblent rester plutôt localisées ventralement dans l'utérus. Il a été suggéré que ces types de contractions peuvent aider à la bonne localisation de l'implantation embryonnaire ainsi qu'à éviter le reflux de l'embryon vers les oviductes (Kunz *et al.*, 2006). Chez la jument, elles peuvent aussi être présentes lors de la phase lutéale, car des billes de polypropylène remplies d'eau stérile et placées dans l'utérus 2 - 4 jours après ovulation, changent de localisation tout au long du diœstrus mais restent toujours localisées au niveau du corps utérin et dans la zone de la bifurcation entre le corps et les cornes de l'utérus (Rivera del Alamo *et al.*, 2008).

Pour renforcer le consensus croissant d'une exposition fréquente de l'utérus à des microorganismes, il a été observé que lors de la gestation chez la femme, le bouchon muqueux inhibe mais ne bloque pas le passage des bactéries, et une partie arrive à traverser le cervix par voie ascendante (Hansen *et al.*, 2014). En outre, de plus en plus de recherches soutiennent aujourd'hui la présence d'un microbiote propre de l'utérus sain, tant chez la femme que chez des animaux domestiques (Poole *et al.*, 2023), dont la jument (Heil *et al.*, 2018, Holyoak *et al.*, 2022). Ce qui contredit de manière évidente le concept d'un utérus stérile.

À la différence des autres systèmes muqueux de l'organisme, le système immunitaire de la muqueuse endométriale est très précisément régulé par le système endocrinien (Wira *et al.*, 2015), pour s'adapter aux besoins immunitaires de l'utérus qui sont fondamentalement distincts dans les deux phases du cycle. Le degré d'exposition de l'utérus à des contaminations externes est plus important lors de l'œstrus que dans les autres phases reproductive. L'augmentation des contractions utérines, avec la relaxation et l'ouverture du cervix, augmentent les risques de contamination dans cette phase du cycle. De plus, chez la jument, la longue durée de l'œstrus augmente le temps d'exposition et, par conséquent, les risques de contamination, ce qui augmente probablement le défi chez cette espèce. Il ne faut pas oublier que durant l'œstrus, l'endomètre doit faire face à la saillie et donc, à des quantités variables d'agents pathogènes et autres contaminants qui accompagnent les spermatozoïdes, perturbant ainsi l'homéostasie utérine, laquelle doit être rapidement rétablie. Ceci est davantage important chez la jument chez qui le dépôt de sperme se fait directement dans l'utérus (Katila, 2011) sans filtre préalable des contaminants au niveau cervico-vaginal. La surveillance immunitaire locale et la réponse aux agents pathogènes doivent donc être renforcées durant cette phase du cycle, par rapport au diœstrus où, bien que démontrée présente, l'exposition de l'utérus à des antigènes est moindre.

Par ailleurs, la survie de l'embryon/fœtus, de par sa nature semi-allogène, dépend de l'adaptation de la réponse immunitaire. Ainsi, l'utérus gestant fait partie des sites immunitaires de l'organisme considérés comme privilégiés (Niederkorn, 2006), où les réponses immunitaires susceptibles de causer des dommages collatéraux néfastes à la survie de l'embryon/fœtus sont atténuées, au profit d'autres réponses moins dangereuses (Niederkorn, 2006).

De cette manière, la réponse de l'utérus face à l'inoculation intra-utérine d'une suspension bactérienne de *Escherichia Coli* chez des juments en diœstrus (Christoffersen *et al.*, 2010) se traduit par une réaction inflammatoire beaucoup plus importante et prolongée dans le temps, avec des signes cliniques plus prononcés et une croissance bactérienne plus sévère et persistante, que quand l'inoculation est réalisée lors de l'œstrus (Christoffersen *et al.*, 2012). La réaction inflammatoire est en réalité plus rapide et sévère en œstrus, mais elle est aussi résolue beaucoup plus rapidement dans cette phase du cycle.

3.2 Résilience

Malgré l'exposition fréquente de la muqueuse endométriale à des agents potentiellement pathogènes et commensaux, l'incidence des infections utérines, en l'absence d'autres pathologies concomitantes, n'est pas très élevée chez la jument (Holyoak *et al.*, 2022), et leur présence ne déclenche pas toujours de réaction inflammatoire (Davis *et al.*, 2013). Ainsi, la détection de microorganismes dans des cultures microbiennes utérines chez la jument n'est pas nécessairement corrélée à la présence de signes d'inflammation (LeBlanc *et al.*, 2007). Cette résilience utérine, ou capacité à prévenir le développement des affections utérines, repose sur des stratégies de défense du système immunitaire des muqueuses qui contribuent à prévenir l'établissement d'une infection au niveau de l'utérus (Ayres et Schneider, 2012, Sheldon *et al.*, 2020). Ces stratégies ne sont pas seulement fondées sur des mécanismes destinés à attaquer et détruire les antigènes potentiellement pathogènes. L'évitement de la contamination de l'utérus et la tolérance de l'organisme face à la présence de ces antigènes sont des mécanismes également essentiels pour maintenir l'homéostasie utérine et éviter une stimulation systématique du système immunitaire (Ayres et Schneider, 2012), ce qui serait néfaste pour la fertilité et/ou la survie du fœtus.

3.2.1 Évitements

L'évitements ou la prévention proprement dite, désigne la capacité à limiter l'exposition de l'organisme à des pathogènes et autres antigènes externes, et de cette manière, diminuer le risque d'infections et de maladies (Kiesecker *et al.*, 1999). La compartimentation du tractus génital et la présence des barrières anatomiques délocalisées par rapport à la surface de la muqueuse utérine sont les premières mesures du système de défense de l'endomètre pour mener à bien cette limitation de l'exposition de l'utérus à des contaminants externes. Chez la jument, elles sont au nombre de trois (Figure 12) :

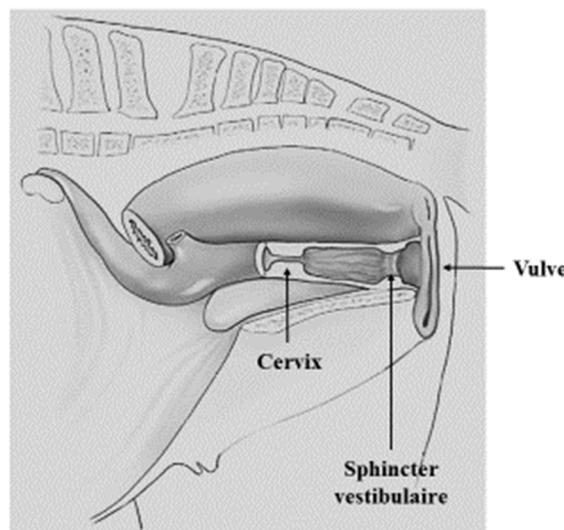


Figure 12. Vue latérale des organes reproducteurs de la jument. Les trois barrières anatomiques qui séparent l'utérus du milieu extérieur sont indiquées (D'après (Brinsko *et al.*, 2011a) - modifiée).

La vulve, première barrière et la plus externe, forme la limite entre l'environnement extérieur et le tractus génital. Elle empêche l'entrée d'air, de matières fécales ou d'autres contaminants (Paccamonti et Pyccock, 2009).

Le sphincter vestibulaire peut être considéré comme étant la barrière la plus importante dans la protection de l'utérus contre les contaminations par voie ascendante (Hinrichs *et al.*, 1988). Contrairement aux autres barrières, il n'est pas influencé par les variations hormonales durant le cycle oestral et reste actif pendant l'œstrus.

Le col de l'utérus constitue la barrière la plus interne. Ce sphincter musculaire à paroi épaisse, constitué chez la jument par des replis longitudinaux, contient des glandes sécrétrices de mucus (Katila, 2012). Ce mucus soutient le rôle des barrières anatomiques. Pendant l'œstrus, il devient plus fluide, entraînant vers l'extérieur tout contaminant possible dans son chemin ascendant vers l'utérus. Pendant le diœstrus et la gestation, le mucus plus visqueux scelle le canal cervical pour éviter, ou plus précisément limiter, le passage au travers du col de microorganismes ou d'autres contaminants.

Enfin, le microbiote vaginal joue aussi un rôle très important dans la protection des parties les plus crâniales de l'appareil reproducteur, en créant un environnement hostile pour la plupart des autres microorganismes susceptibles de l'envahir (Dumont *et al.*, 2020).

3.2.2 Tolérance

La tolérance – à ne pas confondre avec la tolérance immunitaire – englobe des mécanismes dont la fonction n'est pas de détruire et éliminer des antigènes, mais de réduire l'impact de leur présence dans l'organisme de l'hôte (Ayres et Schneider, 2012). Le principe de tolérance provient de l'étude des plantes et de leurs mécanismes de défense face aux microorganismes pathogènes et aux herbivores (Schafer, 1971). Récemment, des mécanismes de tolérance ont été reconnus chez des animaux (Ayres et Schneider, 2012, Sheldon *et al.*, 2020), mais à notre connaissance, le concept de tolérance n'a pas été évoqué explicitement dans la littérature en lien avec la reproduction équine. Toutefois, le système immunitaire des muqueuses de l'endomètre chez la jument permet l'arrivée et la présence de microorganismes, ainsi que d'autres antigènes dans la lumière utérine, sans pour autant stimuler systématiquement de réponse immunitaire. De ce fait, des mécanismes de protection locale existent dans l'utérus, comme dans les autres systèmes immunitaires de muqueuses, pour résister à l'infection microbienne et éviter le déclenchement de la réaction inflammatoire, tout en maintenant l'utérus prêt à répondre rapidement face à une agression extérieure (Fahey *et al.*, 2005b, Ayres et Schneider, 2012).

Barrières fonctionnelles

Les cellules épithéliales de l'endomètre forment une interface ininterrompue entre la lumière utérine et les cellules des tissus sous-jacents, deux fois moins résilientes que les cellules épithéliales (Amos *et al.*, 2014, Healy *et al.*, 2015).

Cette barrière très efficace est formée par une couche simple de cellules polarisées interconnectées par des jonctions serrées (McRae, 1988, Tunón *et al.*, 1995) qui maintiennent l'intégrité et la polarité cellulaire, essentielles pour la protection de l'organisme. Elle présente une perméabilité sélective qui évite le passage des bactéries commensales et agents pathogènes vers l'organisme, tout en permettant le flux des molécules et des ions à travers l'épithélium (Wira *et al.*, 2005a). Cette perméabilité est elle-même sujette aux changements cycliques, notamment sous l'influence des œstrogènes, car la perméabilité transépithéliale ne semble pas être affectée par la progestérone (Murphy *et al.*, 1981). Les œstrogènes, en se fixant sur leurs propres récepteurs au niveau cellulaire, vont moduler l'expression des protéines (Grant-Tschudy et Wira, 2004), ce qui conduit à la déformation des jonctions serrées et augmente la perméabilité de l'épithélium (Wira *et al.*, 2015). La perturbation des jonctions serrées ou de la surface épithéliale favorise le développement des infections locales, voire systémiques, nuisibles à la fertilité et/ou la santé maternelle.

Les cellules épithéliales font partie des cellules sentinelles du système immunitaire des muqueuses. Elles sont capables d'activer et réguler une réponse inflammatoire par contact direct avec les antigènes et par la sécrétion de médiateurs de l'inflammation (Wira *et al.*, 2005b). Les cellules endométriales produisent des mucines, glycoprotéines de grand poids moléculaire, qui avec des quantités variables d'eau (Freeman *et al.*, 1990), forment un gel muqueux recouvrant la surface apicale de l'endomètre. Ce gel muqueux adhère aux microorganismes, limitant ainsi leur contact avec la muqueuse endométriale, ce qui réduit les interactions directes avec les cellules épithéliales (Lagow *et al.*, 1999) ou toute autre cellule immunitaire présente dans le tissu endométrial, évitant ainsi le déclenchement d'une réponse inflammatoire.

Barrières chimiques

Les sécrétions endométriales qui baignent la lumière de l'utérus ont une activité bactéricide, fongicide et/ou virucide (Strzemienski *et al.*, 1984, Watson *et al.*, 1987c, Fahey et Wira, 2002, Fahey *et al.*, 2005a, Bregón-Villahoz *et al.*, 2021). Les premières études liées à cette activité antimicrobienne chez la jument ont été focalisées sur la capacité du liquide utérin à favoriser la migration des neutrophiles et la phagocytose des microorganismes par ces mêmes cellules immunitaires (Strzemienski *et al.*, 1984, Watson *et al.*, 1987c).

Cependant, la quantité de ces cellules immunitaires dans la lumière utérine équine en absence d'inflammation n'est pas très importante (Kenney, 1978, Schoon *et al.*, 1992), et pourtant le liquide utérin a la capacité d'inhiber la croissance des microorganismes en conditions physiologiques (Strzemienski *et al.*, 1984).

De manière semblable aux autres surfaces muqueuses, les cellules épithéliales de l'endomètre sécrètent dans la lumière utérine un large spectre de molécules, appartenant tant au système immunitaire inné qu'adaptatif. Guère n'est encore connu à propos de ces molécules d'origine endométriale chez la jument, mais des immunoglobulines A sécrétoires (sIgA) et G (IgG) de production locale sont présentes de manière constitutive dans l'utérus des juments cycliques (Asbury *et al.*, 1980, Mitchell *et al.*, 1982, Williamson *et al.*, 1983, Widders *et al.*, 1984, 1985, Waelchli et Winder, 1991), où elles pourraient empêcher les antigènes d'accéder aux récepteurs des cellules épithéliales et déclencher la réaction inflammatoire (Goldsby *et al.*, 2003). Les immunoglobulines A (IgA), les plus prédominantes sur les surfaces muqueuses, lorsqu'elles sont liées au composant sécrétoire n'ont pas un grand potentiel de fixation au complément, et donc ne promeuvent pas la phagocytose ou la lyse des microorganismes (Snoeck *et al.*, 2006). Néanmoins, elles ont une fonction effectrice très importante au niveau de la surface de la muqueuse où elles inhibent l'infection virale et la colonisation bactérienne (Goldsby *et al.*, 2003). En se fixant aux microorganismes, et leurs toxines, les sIgA forment des complexes qui sont englobés dans le mucus (Goldsby *et al.*, 2003). Des facteurs du système du complément sont également présents dans l'utérus des juments saines, pouvant participer activement à la capacité d'opsonisation des sécrétions utérines (Håkansson *et al.*, 1993).

Des peptides et protéines antimicrobiens sont synthétisées et/ou sécrétées dans la lumière utérine par les cellules endométriales. Un stimulus spécifique, comme une infection ou toute autre agression, peut induire la synthèse et la sécrétion de ces molécules (Marth *et al.*, 2016a). Cependant, au moins une partie d'entre elles est exprimée de manière constitutive par les cellules épithéliales de l'endomètre chez la jument, de manière dépendante ou non de la phase du cycle oestral (Katila *et al.*, 1990, Kolm *et al.*, 2006, Schöniger *et al.*, 2013, Schöniger *et al.*, 2018). Ces substances sont capables d'inhiber la croissance des microorganismes par des mécanismes différents comme la disruption de la perméabilité de la membrane cellulaire, l'inhibition des éléments nécessaires pour le métabolisme des microorganismes ou en interférant avec les enzymes bactériennes.

La synthèse, la sécrétion ou l'expression d'une partie de ces molécules ont été déjà étudiées dans l'endomètre équin (Katila *et al.*, 1990, Kolm *et al.*, 2006, Schöniger *et al.*, 2013, Marth *et al.*, 2016a, Schöniger *et al.*, 2016, Schöniger *et al.*, 2018). La localisation au niveau endométrial ainsi que la synthèse et la sécrétion par rapport à la phase reproductive dépend fortement de la molécule étudiée. Pour donner quelques exemples, les β -défensines, considérées comme des antibiotiques naturels dans les différentes surfaces muqueuses de l'organisme (Schneider *et al.*, 2005), sont présentes dans l'utérus chez la jument (Schöniger *et al.*, 2013, Schöniger *et al.*, 2016). Ces peptides capables d'affecter la perméabilité membranaire des bactéries, des champignons et de quelques virus enveloppés (Schneider *et al.*, 2005), sont sécrétés par l'épithélium luminal de manière constitutive tout au long du cycle oestral (Schöniger *et al.*, 2013, Schöniger *et al.*, 2016). L'indoléamine 2,3 dioxygénase, une enzyme capable de dégrader le tryptophane nécessaire pour la croissance bactérienne, est également exprimée de manière stable tout au long du cycle oestral. Cependant, ce sont les cellules épithéliales des glandes moyennes et profondes qui les expriment majoritairement (Schöniger *et al.*, 2018). D'autres protéines, telles que la lactoferrine, sont hormono-dépendantes. Leur synthèse et sécrétion sont stimulées lors de l'œstrus, sous imprégnation œstrogénique, tandis qu'elles sont inhibées par la progestérone (Kolm *et al.*, 2006).

Les cellules épithéliales de l'endomètre secrètent aussi des chimiokines et des cytokines sans qu'un stimulus inducteur, mise à part l'influence hormonale du cycle, soit nécessaire (Fahey *et al.*, 2005b). Ces médiateurs de l'inflammation se retrouvent ainsi dans les sécrétions utérines (Wojtysiak *et al.*, 2020), parfois à des concentrations suffisantes pour moduler la fonction des cellules immunitaires effectrices (Fahey *et al.*, 2005b). L'expression constitutive de l'ARNm de différentes cytokines pro-inflammatoires (Fumuso *et al.*, 2003, Christoffersen *et al.*, 2012, Woodward *et al.*, 2013a) et anti-inflammatoires (Fumuso *et al.*, 2006, Fumuso *et al.*, 2007, Christoffersen *et al.*, 2012, Woodward *et al.*, 2013a) a été démontrée dans l'endomètre chez la jument avant une stimulation antigénique. Il a été suggéré que la présence de ce type de médiateurs de l'inflammation pourrait contribuer à la surveillance du système immunitaire inné pour y procurer une réponse rapide en cas d'agression externe (Fahey *et al.*, 2005b), vu leurs propriétés microbicides et/ou activatrices des cellules immunitaires.

Ainsi, en synergie avec le mucus, ces molécules confèrent à l'utérus une défense immunitaire immédiate en créant un environnement hostile pour la plupart des microorganismes, limitant la prolifération et, par conséquent, la colonisation de l'utérus.

Barrières biologiques

Grâce à l'utilisation de méthodes basées sur le séquençage, un microbiote propre à l'utérus a récemment été mis en évidence chez la femme (Medina-Bastidas *et al.*, 2022). La fonction du microbiote endométrial et son rôle dans la défense de l'utérus contre des agents infectieux ne sont pas encore complètement connus. Cependant, il semble jouer un rôle important dans la physiologie utérine et dans la reproduction, car il semble exister des différences tant dans la composition que dans l'abondance entre le microbiote de femmes fertiles et celui de celles qui présentent des problèmes d'infertilité (Medina-Bastidas *et al.*, 2022).

Le microbiote utérin chez la jument est encore peu connu, mais des similitudes avec le microbiote cervico-vaginal existent, probablement expliquées par l'ouverture du cervix et la communication facile entre l'utérus et le vagin chez cette espèce (Heil *et al.*, 2018). En outre, le microbiote utérin semble différer selon la localisation géographique de la jument. Néanmoins, un microbiote central serait partagé dans cette espèce (Holyoak *et al.*, 2022).

Il est intéressant de noter que des microorganismes du genre *Streptococcus*, *Escherichia* et *Staphylococcus*, qui ont toujours été considérés comme des agents pathogènes responsables des infections utérines chez la jument, sont aujourd'hui identifiés comme faisant partie intégrante du microbiote utérin de la jument saine (Holyoak *et al.*, 2022).

Clearance utérine mécanique

Les microorganismes, ainsi que tout autre contaminant ou débris cellulaire, qui se trouvent piégés dans le mucus utérin, inactivés ou inhibés par les médiateurs chimiques des sécrétions endométriales, sont expulsés de l'utérus grâce au système mucociliaire et aux contractions myométriales.

Le système mucociliaire promeut le déplacement du mucus vers l'extérieur au travers de la mobilité coordonnée des cils. À l'inverse, dans d'autres organes, ce mécanisme de clearance n'a pas reçu beaucoup d'attention au niveau de l'utérus de la jument (Causey, 2007). Cependant, l'endomètre équin contient tous les composants impliqués dans la clearance mucociliaire, à savoir des cellules sécrétoires et ciliées en alternance en-dessous d'une couche de mucus (Tunón *et al.*, 1995, Causey, 2007). En outre, le battement de cils des cellules endométriales de la jument a pu être mis en évidence (Causey, 2007).

Malgré le manque d'études qui montrent le mouvement du mucus coordonné avec les mouvements des cils, la présence de cette clearance via un système mucociliaire peut être fortement suspectée chez la jument.

3.2.3 Résistance

Lorsque les mécanismes de tolérance sont dépassés, le danger est détecté par les cellules sentinelles du système endométrial des muqueuses, et les mécanismes de résistance prennent le relais. Ces derniers sont la fonction du système immunitaire, dont l'objectif est de détruire et d'éliminer les microorganismes ainsi que tout autre antigène potentiellement pathogène pour l'organisme (Ayres et Schneider, 2012).

Deux lignes de défense synergiques et complémentaires (Iwasaki et Medzhitov, 2010) sont présentes dans la muqueuse endométriale, à savoir la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative ou acquise. L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme face à un agent pathogène. C'est une réponse presque immédiate et non-spécifique de l'antigène. Par contre, l'immunité adaptative est dépendante et spécifique de l'antigène auquel l'organisme doit faire face et prend plus de temps à être activée. Elle est caractérisée par sa capacité de mémoire immunitaire en créant des anticorps contre les antigènes auxquels l'organisme a déjà été exposé, ce qui permet une réponse plus rapide lors d'une éventuelle réexposition (Goldsby *et al.*, 2003).

Au niveau du système immunitaire de l'endomètre, la réponse immunitaire innée est souvent suffisante pour surmonter la plupart des dangers qui défient l'utérus, tandis que l'immunité adaptative fournit un supplément au système défensif (Sheldon *et al.*, 2016).

3.3 Cellules immunitaires dans l'endomètre

Pendant l'œstrus, une accumulation marginale de neutrophiles est observée au niveau des vaisseaux sanguins (Figure 13). Cependant, contrairement à d'autres femelles domestiques, telles que la vache (DeBois et Manspeaker, 1986) ou la truie (Kaeoket *et al.*, 2002), la présence des neutrophiles en dehors des vaisseaux, dans le tissu endométrial ou la lumière utérine, est rare en l'absence d'inflammation (Kenney, 1978).

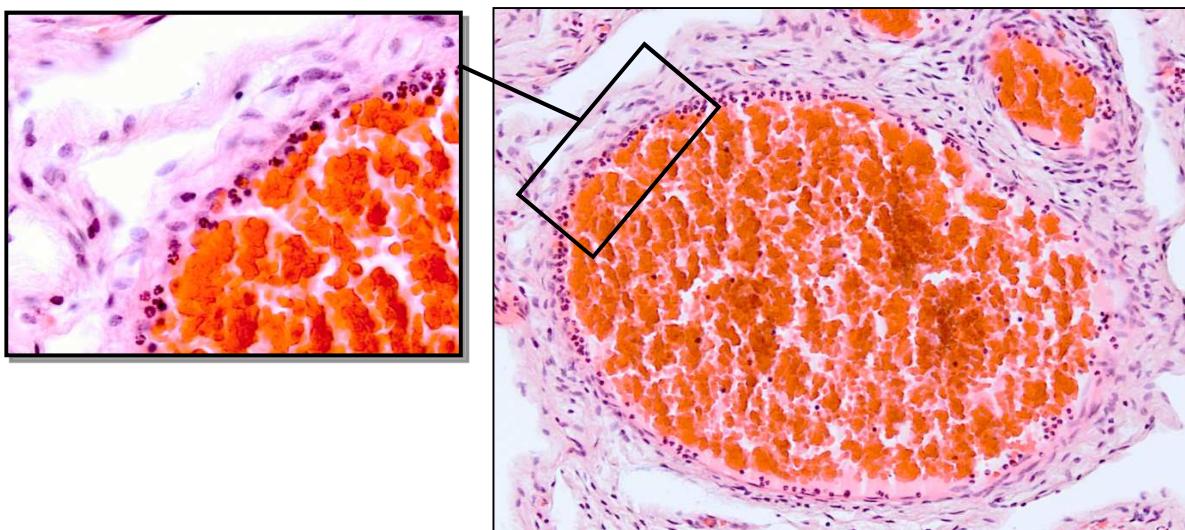


Figure 13. Marginalisation des neutrophiles dans les vaisseaux lors de la phase folliculaire du cycle. Grossissement 100x (en médaillon 200x). Source : auteur.

Durant les autres phases du cycle reproducteur, la marginalisation des neutrophiles dans les vaisseaux sanguins ou leur présence dans le tissu endométrial est systématiquement considérée comme un signe d'inflammation (Kenney, 1978, Schoon *et al.*, 1992).

Outre les neutrophiles, de faibles quantités d'autres cellules immunitaires peuvent être présentes, en conditions physiologiques, dans la *lamina propria* de l'endomètre équin. Les lymphocytes T représentent le type de cellules mononucléaires le plus fréquent dans l'endomètre, bien que leur quantité soit toujours modérée et variable d'une jument à l'autre (Rudolph *et al.*, 2017). Ils sont plus abondants dans le *stratum compactum* que dans le *stratum spongiosum*. Les lymphocytes auxiliaires (CD4⁺) sont généralement plus nombreux dans le *stratum compactum* que les lymphocytes cytotoxiques (CD8⁺) (Watson et Dixon, 1993, Watson et Thomson, 1996, Rudolph *et al.*, 2017), tandis que dans le *stratum spongiosum*, la proportion de ces deux phénotypes semble plus équilibrée. Les lymphocytes T peuvent être aussi observés autour des glandes ou des vaisseaux (Watson et Dixon, 1993, Frayne et Stokes, 1994, Watson et Thomson, 1996, Kiose et Schoon, 2016).

La présence des plasmocytes, souvent localisés dans les régions sous-épithéliales, est rare (Rudolph *et al.*, 2017). Les macrophages ne sont observés qu'occasionnellement (Rudolph *et al.*, 2017). Quant aux lymphocytes B, ils sont pratiquement absents de l'endomètre en l'absence de pathologies, et leur présence est considérée comme anecdotique (Watson et Dixon, 1993, Watson et Thomson, 1996, Rudolph *et al.*, 2017).

Dans l'épithélium luminal et glandulaire, les cellules mononucléées sont très rares et concernent presque exclusivement les lymphocytes T (Summerfield et Watson, 1998, Rudolph *et al.*, 2017), à l'exception de la région du corps de l'utérus située près du cervix, où les macrophages sont plus fréquemment observés, tant dans l'épithélium que dans la *lamina propria* (Tunón *et al.*, 1995, Rudolph *et al.*, 2017).

Bien que toujours faible, la quantité de ces cellules immunitaires dans l'endomètre varie considérablement d'une jument à l'autre (Kiose et Schoon, 2016, Rudolph *et al.*, 2017), sans que leur nombre semble être influencé par les phases du cycle oestral (Watson et Dixon, 1993, Watson et Thomson, 1996, Summerfield et Watson, 1998). La littérature ne fournit pas de données spécifiques concernant la présence de ces cellules durant l'anœstrus saisonnier. Toutefois, une étude menée chez des juments ovariectomisées a montré une réduction de la présence des lymphocytes T par rapport aux juments cyclées, avec seulement quelques petits agrégats et des cellules dispersées dans la *lamina propria* (Frayne et Stokes, 1994).

Ces cellules représentent des composants normaux de la défense immunitaire de l'utérus. Leur faible nombre suggère qu'elles font partie, en première ligne, d'un mécanisme de surveillance plutôt que de défense dans le tissu endométrial (Watson et Thomson, 1996). Par ailleurs, la variabilité interindividuelle en termes de nombre et de phénotypes pourrait résulter de défis immunitaires antérieurs auxquels l'utérus de chaque jument a été exposé (Rudolph *et al.*, 2017)

4. ENDOMÉTRITE

L'endométrite, ou inflammation de l'endomètre, est une cause majeure d'infertilité chez la jument (Troedsson, 1999). Dans une étude menée auprès de vétérinaires praticiens, l'endométrite a été recensée comme étant le 3^{ème} problème médical le plus fréquent chez les chevaux adultes, après les coliques et les maladies respiratoires d'origine virale (Traub-Dargatz *et al.*, 1991).

L'endomètre doit résister aux variations, en nature ou en quantité, des microorganismes qui habitent l'utérus, qu'elles résultent d'affections de l'appareil reproducteur ou d'un manque d'hygiène. Néanmoins, des événements courants et physiologiques en lien direct avec la fonction reproductive, tels que la saillie ou la mise bas, exposent également l'utérus à des contaminations et à d'autres processus qui dépassent les mécanismes d'évitement et de tolérance, et sont également responsables de l'activation immunitaire de la muqueuse endométriale.

4.1 Endométrite de post-saillie

Tant la saillie naturelle que l'insémination artificielle sont associées à une réaction inflammatoire de l'endomètre ou endométrite dite de post-saillie chez plusieurs espèces (Rozeboom *et al.*, 1998, England *et al.*, 2012, Elweza *et al.*, 2018) dont la jument (Kotilainen *et al.*, 1994, Katila, 1995). Pour faciliter la lecture de ce texte, le terme « saillie » sera utilisé pour se référer tant à la saillie naturelle qu'à l'insémination artificielle.

L'endométrite de post-saillie a pour objectif d'éliminer tout excès de spermatozoïdes, plasma séminal et tout autre contaminant introduit dans l'utérus lors de la saillie, pour assurer un environnement compatible avec la survie d'un possible embryon et le bon développement de la gestation. Chez la plupart des espèces, telle que la vache, le sperme est naturellement déposé dans le vagin. Une partie des spermatozoïdes vivants et mobiles, probablement accompagnés de quelques microorganismes, migrent dans l'utérus au travers du cervix tandis que le plasma séminal reste dans le vagin avec une bonne partie des spermatozoïdes. Chez la jument, tout comme chez la truie, la contamination de l'utérus est plus importante car, comme déjà évoqué, le dépôt du sperme se fait directement dans l'utérus (Katila, 2011) sans filtre préalable des contaminants et/ou spermatozoïdes au niveau cervico-vaginal, entraînant une réponse inflammatoire post-saillie accrue (Zerbe *et al.*, 2003).

Chez la jument, l'endométrite de post-saillie est ainsi un événement physiologique et prévisible, mais également transitoire. Les juments considérées comme physiologiques sont capables de résoudre l'inflammation dans les 24 à 36 h (LeBlanc *et al.*, 1994, Katila, 1995) suivant la saillie et ce, bien avant l'arrivée de l'embryon dans l'utérus. Une inflammation intense, mais de résolution rapide, empêche la colonisation de l'utérus par des microorganismes ainsi que le besoin d'une réponse du système immunitaire acquis dirigée contre les spermatozoïdes (Hansen, 2011). Le passage de ces derniers dans le tractus génital de la jument doit être toléré et est même souhaité pour le développement d'un environnement d'immunotolérance vis-à-vis des antigènes de l'étalon et du développement de l'embryon (Canisso *et al.*, 2020). La formation des anticorps anti-spermatozoïdes par le système immunitaire acquis doit donc être évitée car elle serait très néfaste pour l'efficacité reproductive future de la jument (Canisso *et al.*, 2020).

Pendant très longtemps, il a été accepté que l'endométrite de post-saillie chez la jument était le résultat de l'introduction de bactéries et d'autres microorganismes dans l'utérus lors de la saillie. En conséquence, la plupart des études effectuées sur ce sujet ont été réalisées en induisant une infection bactérienne.

En 1994, Kotilainen et al. et d'autres équipes lors d'études postérieures (Kotilainen et al., 1994, Fumuso et al., 2007, Woodward et al., 2013a), ont montré que les spermatozoïdes sont capables par eux-mêmes d'induire la réaction inflammatoire chez la jument, laquelle semble essentiellement similaire à celle provoquée par l'inoculation de bactéries (Pycock et Allen, 1990, Christoffersen et al., 2012, Marth et al., 2016a). De manière semblable, le plasma séminal, les dilueurs utilisés pour préparer les doses d'insémination et même des solutions physiologiques introduits séparément dans l'utérus provoquent aussi une réaction inflammatoire endométriale (Kotilainen et al., 1994, Palm et al., 2008, Nash et al., 2010), mais tant la rapidité d'initiation que la sévérité de l'inflammation augmentent avec la présence de spermatozoïdes dans l'inoculat (Kotilainen et al., 1994, Fiala et al., 2007, Nash et al., 2010). En outre, la concentration de la dose d'insémination augmente la magnitude de la réaction inflammatoire (Fiala et al., 2007, Cazales et al., 2020). En conditions physiologiques, sans pathologies associées pouvant augmenter le risque de contamination utérine, ce sont donc les spermatozoïdes qui semblent être les responsables majeurs de l'endométrite de post-saillie et, même si des bactéries sont probablement toujours présentes dans l'éjaculat ou dans la dose d'insémination, elles sont rapidement éliminées de l'utérus (Kotilainen et al., 1994).

La saillie provoque une augmentation presque immédiate du nombre et de la fréquence des contractions myométriales (Troedsson et al., 1993a). Le contact avec le pénis lors de la saillie naturelle ou la manipulation lors de l'insémination artificielle provoque la stimulation mécanique du vagin et du cervix. Cela entraîne, via le réflexe de Ferguson, la libération d'ocytocine par l'hypophyse postérieure (Madill et al., 2000). L'ocytocine est « un puissant stimulateur de la contraction de l'utérus » (Wray, 1993), tant de manière directe qu'indirecte via la stimulation de la sécrétion de prostaglandines F2 α (PGF2 α) par les cellules endométriales (Cadario et al., 2018), une molécule capable de moduler les contractions utérines (Wray, 1993). La distension de la paroi utérine, due au volume de l'éjaculat ou de l'inoculat, semble également contribuer, par stimulation nerveuse, à l'augmentation de l'activité myométriale (Nikolakopoulos et al., 2000) et/ou à son maintien (Campbell et England, 2004). Ces contractions myométriales, fortes et fréquentes (Katila et al., 2000), sont bidirectionnelles (Kunz et al., 2006) et poussent le sperme dans un mouvement de va-et-vient entre le corps de l'utérus et les cornes utérines (Katila et al., 2000).

Cette première vague, qui est de courte durée (15 - 30 minutes (Troedsson et al., 1993a, Troedsson et al., 1998)), participe au transport rapide des spermatozoïdes, qui peuvent déjà être observés dans les oviductes dans les 30 minutes qui suivent leur dépôt dans l'utérus (Katila et al., 2000, Fiala et al., 2008). Néanmoins, bien que des spermatozoïdes radio-

marqués soient observés par scintigraphie dans le haut des cornes utérines entre 8 et 20 minutes après leur dépôt dans le corps utérin, ils sont également présents au niveau du vagin 30 minutes après l'inoculation (Katila *et al.*, 2000). D'autres études ont également investigué l'évacuation de bactéries, de charbon, et d'autres matériaux inertes après inoculation intra-utérine (Evans *et al.*, 1986, Evans *et al.*, 1987, Troedsson et Liu, 1991, LeBlanc *et al.*, 1995). Ces études montrent que, en plus de faciliter le transport des spermatozoïdes vers les oviductes, les contractions utérines participent à leur sélection et à la clearance mécanique de l'utérus au travers du cervix ouvert en œstrus (Troedsson *et al.*, 1993a, LeBlanc *et al.*, 1994), diminuant ainsi la charge contaminante que l'endomètre doit affronter.

La réponse inflammatoire est un processus très complexe qui englobe différentes voies de signalisation pour recruter des cellules immunitaires au site d'inflammation et éliminer les antigènes pathogènes, le tout en minimisant les dégâts sur les tissus de l'hôte (Canisso *et al.*, 2020). Chez la jument, l'endométrite de post-saillie est caractérisée par un afflux massif de neutrophiles depuis les pools marginaux des vaisseaux, et donc par leur présence dans la lumière utérine et le tissu endométrial. L'activation du système du complément dans les sécrétions utérines par les spermatozoïdes ou les bactéries (Troedsson *et al.*, 1995) engendre l'initiation de la chimiotaxie des neutrophiles vers l'utérus. Ceux-ci arrivent dans la lumière utérine dans les 30 minutes qui suivent le dépôt de sperme (Pycock et Allen, 1990, Katila, 1995), associés à la présence de prostaglandines, de leucotriène B4 et d'autres métabolites de l'acide arachidonique (Watson *et al.*, 1987b, Pycock et Allen, 1988, 1990).

De manière simultanée, le système immunitaire de la muqueuse de l'endomètre détecte le danger via d'autres mécanismes, notamment les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (ou *Pattern Recognition Receptors*, PRR), présents sur les cellules épithéliales de l'endomètre et d'autres cellules immunitaires sentinelles. Ces molécules reconnaissent les pathogènes ou plus précisément des composants spécifiques des pathogènes externes appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP). Parmi les PRR les plus étudiés dans le tractus génital de la jument figurent les récepteurs de type Toll (ou *Toll-like Receptors*, TLR) (Atli *et al.*, 2010).

Les TLR (2, 4 et 6) se trouvent de manière constitutive dans différentes localisations des cellules endométriales chez la jument, ainsi que sous une forme soluble dans les sécrétions utérines (Schöniger *et al.*, 2017), mais leur transcription peut être aussi induite par des stimuli spécifiques (Woodward *et al.*, 2013a, Marth *et al.*, 2016a). La stimulation des TLR dans les cellules sentinelles au contact de l'antigène génère un signal qui va donner lieu à l'activation

Introduction

de la réaction inflammatoire, induisant la chimiotaxie des neutrophiles ainsi que la synthèse et sécrétion de peptides et protéines antimicrobiennes (Wira *et al.*, 2005b, Kawai et Akira, 2010).

Des TLR dans l'endomètre équin reconnaissent les bactéries et initient l'inflammation (Marth *et al.*, 2016b). Toutefois, leur stimulation par les spermatozoïdes n'a pas encore été démontrée chez la jument. Néanmoins, les spermatozoïdes sont reconnus par les TLR localisés dans l'endomètre chez la vache (Elweza *et al.*, 2018, Ezz *et al.*, 2019, Akthar *et al.*, 2020), et l'induction de la réaction inflammatoire conséquente à leur stimulation a été démontrée *in vitro* dans cette espèce. En effet, l'interaction spermatozoïde-TLR stimule rapidement l'expression du gène codant pour le facteur 3 du complément (C3), ainsi que celle des cytokines pro-inflammatoires, incluant des chimiokines (Elweza *et al.*, 2018, Ezz *et al.*, 2019), et par conséquent l'afflux de neutrophiles dans la lumière utérine (Akthar *et al.*, 2020). Un mécanisme similaire de reconnaissance des spermatozoïdes par les TLR endométriaux et, de ce fait, la stimulation de la réponse inflammatoire peut être supposée chez la jument. Comme observé chez la vache, des spermatozoïdes lavés et donc exempts de contamination bactérienne, provoquent une augmentation rapide de l'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules endométriales équines dans les 2 h qui suivent l'inoculation (Woodward *et al.*, 2013a), ce qui corrobore cette supposition. L'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires augmente dans l'utérus de la jument au cours des 6 premières heures qui suivent l'agression, moment auquel elles atteignent leur concentration maximale pour ensuite diminuer de manière progressive (Woodward *et al.*, 2013a). La diminution des cytokines pro-inflammatoires coïncide avec l'augmentation de l'expression des gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires et modulatrices de l'inflammation (Woodward *et al.*, 2013a). Ces dernières régulent la réponse inflammatoire, évitant ainsi une inflammation excessive et/ou chronique.

Après leur arrivée rapide, dans la première demi-heure suivant l'invasion (Katila, 1995), le nombre de neutrophiles augmente dans la lumière utérine pour atteindre le maximum vers 6 - 8 h (Katila, 1995, Zerbe *et al.*, 2003), pic en corrélation avec la synthèse des chimiokines qui favorisent leur recrutement. Cependant, leur évacuation est plus lente et ils restent donc présents dans l'utérus quand les concentrations de cytokines sont déjà revenues à leurs niveaux basaux (Katila, 1995, Zerbe *et al.*, 2003), pour disparaître 24 - 48 h après l'agression (Katila, 1995, Fiala *et al.*, 2007).

La fonction primaire des neutrophiles est de détruire et éliminer les microorganismes, les débris cellulaires, les spermatozoïdes et d'autres antigènes (Kotilainen *et al.*, 1994).

Le système du complément, ainsi que les IgG présentes dans les sécrétions utérines, possèdent une capacité d'opsonisation même en conditions pré-inflammatoires (Hákansson *et al.*, 1993, Troedsson *et al.*, 1993b). Ainsi, ils assistent les neutrophiles lors de la phagocytose et l'élimination des antigènes dès leur arrivée dans l'utérus (Troedsson *et al.*, 1993b, Kotilainen *et al.*, 1994). En effet, les concentrations de C3 et d'IgG dans les sécrétions utérines diminuent lors des premières 24 h après la saillie, ce qui est probablement le résultat de leur consommation pendant la réponse inflammatoire (Troedsson *et al.*, 1993b). L'afflux rapide de neutrophiles dans l'utérus contribue probablement à l'élimination des bactéries avant que l'infection ne soit établie, car même l'inoculation de préparations bactériennes pendant l'œstrus ne conduit pas à une croissance bactérienne au-delà de 12 h après l'intervention (Woodward *et al.*, 2013a).

Les molécules antimicrobiennes présentes de manière constitutive ou cyclique dans l'utérus jouent probablement un rôle dans la limitation de la croissance bactérienne et la prévention de l'établissement d'une infection. Leur expression par les cellules endométriales peut également être induite après reconnaissance et stimulation de celles-ci par des antigènes. Bien que peu soit encore connu sur ces molécules dans l'endomètre de la jument, une augmentation de l'expression des gènes codant pour certaines d'entre-elles a été observée en réponse à une inoculation de *Escherichia Coli* (Marth *et al.*, 2015, Marth *et al.*, 2016a). Les profils d'expression variaient selon les molécules, avec un pic maximal entre 3 h et 12 h pour certaines, tandis que d'autres ne montraient pas de variation significative par rapport aux niveaux pré-inoculation bactérienne. La diminution de l'expression de l'ARNm était également dépendante de la molécule. Ces différences entre molécules suggèrent que leur induction est finement régulée par le système immunitaire de l'utérus en fonction des menaces spécifiques auxquelles il est confronté (Marth *et al.*, 2016a).

Le stimulus inflammatoire induit par la saillie provoque aussi l'expression endométriale de COX-2, qui entraîne la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Palm *et al.*, 2008, Nash *et al.*, 2010). Ces prostaglandines, avec les cytokines pro-inflammatoires et l'activation du système du complément, sont à l'origine d'une vasodilatation et donc de l'augmentation de la perfusion utérine (Bollwein *et al.*, 2003). Par conséquent, la perméabilité vasculaire augmente et permet le passage de l'exsudat vers le tissu endométrial, provoquant l'augmentation de l'œdème tissulaire. Ce phénomène coïncide avec une accumulation de liquide (Bollwein *et al.*, 2003), de protéines sériques et de neutrophiles (Pycock et Allen, 1990) dans la lumière utérine. L'essentiel de ce liquide utérin est éliminé dans les 6 - 12 h grâce aux

contractions myométriales, et aucune trace de liquide n'est détectable par échographie 48 h après la saillie (LeBlanc et Causey, 2009).

L'activité myométriale diminue après la première vague de contractions utérines, à la suite de l'inoculation d'agents non antigéniques comme du PBS (Troedsson *et al.*, 1993a). Cependant, en réponse à la saillie ou à une infection bactérienne induite, l'activité utérine reste élevée et une deuxième vague de plus longue durée est observée (Troedsson *et al.*, 1998). La durée de cette vague varie selon les études (Taverne *et al.*, 1979, Troedsson *et al.*, 1993a, Troedsson *et al.*, 1998) et dépend probablement de la nature de l'antigène inoculé. Il a été suggéré que cette deuxième vague pouvait être le résultat de la synthèse et la sécrétion par les neutrophiles et les cellules endométriales de PGF2 α qui, outre son rôle de médiateur de l'inflammation, provoque des contractions de la musculature lisse, incluant le myomètre. Cette deuxième vague participe activement à la clearance du liquide, des produits inflammatoires, des neutrophiles et des débris cellulaires, via le cervix et le système lymphatique. Ce dernier est responsable de l'élimination de tout produit résiduel de l'inflammation ainsi que du drainage de l'œdème endométrial après l'ovulation et la fermeture du col (LeBlanc *et al.*, 1995).

Une fois que le liquide utérin, les produits résultant de l'inflammation ainsi que les antigènes qui l'initient sont évacués de la lumière utérine, l'endométrite est résolue et l'utérus retrouve l'environnement antérieur au stimulus inflammatoire (Troedsson, 2006).

4.2 Endométrite persistante de post-saillie

L'endométrite est un phénomène physiologique de résistance absolument nécessaire à la reproduction équine. Cependant, elle doit rester transitoire. Si l'inflammation persiste au-delà des 24 à 36 h après la saillie (LeBlanc *et al.*, 1994, Katila, 1995), l'endométrite, initialement physiologique, devient pathologique affectant considérablement la fertilité équine.

En 1969, Hughes et Loy ont observé qu'après l'induction d'une infection bactérienne, la majorité des juments parvenaient à éliminer les agents infectieux de l'utérus et à rétablir rapidement l'environnement utérin physiologique, tandis qu'un sous-groupe de juments restaient infectées de manière chronique. Depuis cette étude, les juments sont classées comme résistantes ou susceptibles, selon leur capacité ou non à ne pas développer une endométrite persistante (Troedsson, 1999) ou prolongée (Katila et Ferreira-Dias, 2022) après la saillie ou l'induction d'une infection.

4.3 Enjeux sur la fertilité

L'endométrite est localisée au niveau utérin et ne constitue pas un risque vital pour la jument mais diminue sa fertilité, de manière directe et indirecte. D'une part, les chances de gestation diminuent lorsque le sperme est déposé dans un environnement inflammatoire. Bien que les spermatozoïdes, en présence de plasma séminal, puissent survivre dans ces conditions, leur mobilité se voit altérée en raison d'une liaison abondante avec les neutrophiles présents dans la lumière utérine (Alghamdi *et al.*, 2001). D'autre part, l'endométrite est une cause majeure de perte embryonnaire chez la jument (Woods *et al.*, 1987). Si une gestation a lieu alors que l'inflammation persiste après la fermeture du col, elle sera compromise par l'environnement inflammatoire dans lequel elle devra se développer (Vanderwall, 2008). La présence des prostaglandines d'origine inflammatoire dans l'utérus au-delà du 6^{ème} jour post-ovulation, moment auquel le corps jaune devient sensible à leur action, peut entraîner la lutéolyse prématuée et donc la chute de la progestéronémie et le retour en chaleur. Cela se traduit cliniquement par le raccourcissement des cycles chez la jument et la perte de la gestation (Adams *et al.*, 1987). En outre, à ce stade, l'embryon arrive dans l'utérus, depuis les oviductes, dans un environnement hostile. Les effets cytotoxiques des produits inflammatoires sur l'embryon (Robertson *et al.*, 2018) sont également responsables de la mortalité embryonnaire (Troedsson, 2006) et par conséquent de la perte de la gestation.

De manière indirecte, la persistance de l'endométrite favorise le développement d'autres affections endométriales ayant un impact important sur la fertilité équine. Les endométrites, sont des inflammations et pas nécessairement des infections (Nikolakopoulos et Watson, 1999, Reilas *et al.*, 2016, Katila et Ferreira-Dias, 2022). Néanmoins, une réponse immunitaire inadéquate, et/ou l'échec de la clearance utérine mécanique, peut permettre la croissance et la colonisation des microorganismes, favorisant l'installation d'une endométrite infectieuse qui pourrait devenir chronique (Morris *et al.*, 2020, Katila et Ferreira-Dias, 2022).

La persistance de l'endométrite est également en relation directe avec le développement de l'endométreose chez la jument (Reilas *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'endométreose est associée à une diminution de la clearance utérine, ce qui constitue un facteur prédisposant à la persistance de l'endométrite de post-saillie (Woodward *et al.*, 2012), créant un cercle vicieux entre les deux entités pathologiques. L'endométreose - à ne pas confondre avec l'endométriose chez la femme - est une pathologie dégénérative caractérisée par divers changements au niveau de l'endomètre équin (Kenney, 1978), affectant de multiples façons la fertilité chez la jument (Katila et Ferreira-Dias, 2022). La caractéristique principale de l'endométreose au niveau microscopique est la fibrose, une accumulation pathologique de collagène dans la

lamina propria, principalement au niveau périglandulaire. Ceci est le résultat d'un processus de réparation endométriale faisant suite à l'inflammation. La fibrose, comme dans un processus cicatriciel, réduit l'élasticité du tissu et a un impact sur la fonction épithéliale (Kenney, 1978). Elle se manifeste par un manque de randomisation des cellules stromales qui vont se disposer de manière concentrique autour des glandes endométriales ou en longeant l'épithélium muqueux directement sous la lame basale. La fibrose périglandulaire peut concerner une branche d'une seule glande ou plusieurs d'entre elles, formant des nids glandulaires (Kenney, 1978). La sévérité de la fibrose est évaluée en fonction du nombre de couches des cellules stromales autour des glandes et du nombre de nids par champ de vision. Cependant, c'est surtout l'étendue de la fibrose par rapport à la surface endométriale qui a le plus d'importance sur la capacité de l'endomètre à soutenir une gestation (Kenney et Doig, 1986, Schoon *et al.*, 1992). L'étude immunohistochimique des différentes protéines d'origine glandulaire (Hoffmann *et al.*, 2009b) ainsi qu'une récente étude protéomique sur le liquide utérin (Diel de Amorim *et al.*, 2020), suggèrent que la fibrose pourrait altérer la fonction des cellules glandulaires utérines. En conséquence, cela pourrait entraîner une diminution de la synthèse et la sécrétion des protéines indispensables au développement embryonnaire, contribuant ainsi à la perte de la gestation et donc à la diminution de la fertilité.

La pathogénie de l'endométrose et les mécanismes connus à ce jour par lesquels l'inflammation utérine participe au développement de la fibrose endométriale ont fait récemment l'objet d'une excellente revue de littérature par Katila et Ferreira-Dias (Katila et Ferreira-Dias, 2022) mais ne seront pas abordés ici.

4.4 Causes

L'endométrite est une pathologie multifactorielle caractérisée par une diminution de l'efficacité du système de défense utérin au niveau de la clearance utérine et/ou de la réponse immunitaire innée.

4.4.1 Âge de la jument

Dans l'étude de Hughes et Loy (1969), les juments susceptibles étaient principalement multipares et d'un âge avancé, tandis que les jeunes juments jamais saillies incluses dans l'étude résistaient à l'inoculation intra-utérine de *Streptococcus Equi Zooepidemicus* et retrouvaient rapidement l'environnement utérin pré-infection. Des études postérieures ont confirmé que l'âge est effectivement associé au risque de développer une endométrite chez la jument (Woodward *et al.*, 2012). Cependant, l'âge lui-même ne semble pas être une cause

déterminante de l'affection. L'avancement de l'âge de la jument, et donc les événements reproducteurs tels que la parturition et les saillies à répétition au cours de la vie, ne font que cumuler et amplifier les facteurs qui la prédisposent. La sévérité de la fibrose endométriale, par exemple, augmente avec l'âge (Ricketts et Alonso, 1991). Un degré modéré à sévère ou sévère de fibrose est par ailleurs corrélé à une augmentation de la susceptibilité à développer une endométrite persistante de post-saillie (Woodward *et al.*, 2012). Ainsi, ce n'est pas l'âge de la jument *sensu stricto* qui est responsable du risque accru d'endométrite, mais le développement progressif de la fibrose endométriale au fil du temps.

4.4.2 Contaminations utérines

Les anomalies conformati onnelles de l'appareil reproducteur représentent des facteurs de risque majeurs de contamination utérine, qui favorisent la mise en place de l'endométrite. Les traumatismes lors du poulinage, une conformation périnéale incorrecte ou un score corporel très bas peuvent être à l'origine d'une incompétence des barrières anatomiques (Trotter et McKinnon, 1988). Une diminution de la fonctionnalité des lèvres vulvaires, du sphincter vestibulaire ou du col utérin compromet leur rôle de séparation avec le milieu extérieur. Cela entraîne une contamination et une irritation continues de l'utérus, face à laquelle le système de défense serait insuffisant (LeBlanc et McKinnon, 2011).

4.4.3 Diminution ou retardement de la clearance utérine mécanique

Différentes études ont établi un lien entre la susceptibilité des juments à développer une endométrite et une diminution de leur capacité à assurer une clairance utérine mécanique efficace (Evans *et al.*, 1986, Troedsson et Liu, 1991, LeBlanc *et al.*, 1994, LeBlanc *et al.*, 1995). Par exemple, en 1991 Troedsson et Liu ont observé que les juments en œstrus considérées susceptibles, n'étaient pas capables d'évacuer la totalité de microsphères Cr51 non-antigéniques introduites immédiatement après l'inoculation de *Streptococcus Equi Zooepidemicus* dans l'utérus, et ce, pendant les 96 h que durait l'étude. En revanche, la présence de ces mêmes microsphères était insignifiante 24 h post-inoculation chez le reste des juments. Quelques années après, LeBlanc et al. ont utilisé la scintigraphie comme outil pour différencier les juments susceptibles des résistantes (LeBlanc *et al.*, 1994). Dans cette étude, les juments résistantes étaient capables d'évacuer 50 % de colloïdes d'albumine marqués au technétium 99 dans les 2 h qui suivaient leur inoculation intra-utérine, contrairement aux juments susceptibles, chez qui le radiocolloïde persistait beaucoup plus longtemps.

Différents facteurs contribuent au retardement et/ou à la diminution de la clearance mécanique de l'utérus. Les juments susceptibles et résistantes peuvent différer de manière très marquée au niveau de leur activité myométriale (Troedsson *et al.*, 1993a). Bien que l'activité utérine augmente après inoculation bactérienne, le début des contractions utérines peut être retardé de 2 h chez les juments susceptibles en comparaison à celles considérées résistantes. Cette activité reste augmentée pendant 24 h chez les juments résistantes, tandis que l'activité peut diminuer en dessous des valeurs pré-inoculation 12 h après l'agression chez les juments susceptibles (Troedsson *et al.*, 1993a). Une altération intrinsèque des contractions myométriales en réponse à l'ocytocine et/ou aux prostaglandines, probablement liée à l'âge (Rigby *et al.*, 2001), une surexpression et une accumulation d'oxyde nitrique dans l'utérus (Alghamdi *et al.*, 2005, Woodward *et al.*, 2013b), la présence de fibrose endométriale (Woodward *et al.*, 2012) ou la diminution de la perfusion, conséquence de l'élastose des vaisseaux endométriaux (Esteller-Vico *et al.*, 2007), ont été proposées comme explications possibles à la diminution de l'activité utérine rencontrée chez les juments susceptibles.

La perte de support structural du système reproducteur caudal, conséquence de l'âge ainsi que de l'étirement des ligaments larges, et la distension de l'utérus lors de gestations précédentes, peuvent modifier l'élasticité de l'utérus ainsi que sa position par rapport au cervix. Un utérus pendulaire ou étiré rend difficile l'évacuation du contenu utérin au travers du cervix (LeBlanc *et al.*, 1994), permettant au liquide de s'accumuler (LeBlanc *et al.*, 1998).

La fermeture du cervix joue un rôle crucial en tant que barrière physique entre l'environnement externe et la lumière utérine, mais son ouverture est essentielle pour une clearance utérine effective (LeBlanc *et al.*, 1994, Reilas *et al.*, 2016). Chez les juments nullipares âgées de plus de 10 ans, le col perd sa masse musculaire et devient fibrotique et allongé, ce qui diminue sa capacité d'ouverture (Pycock, 2009). Les manipulations obstétricales ou les récoltes d'embryons répétées peuvent également entraîner un dysfonctionnement du cervix avec des conséquences similaires (Macpherson et Schlafer, 2015).

4.4.4 Réponse inflammatoire altérée

Des études plus récentes, axées sur les aspects moléculaires de l'endométrite de post-saillie ont montré qu'au-delà de l'altération de la clearance utérine mécanique, l'expression des gènes codant pour des cytokines peut également différer entre les juments susceptibles et résistantes (Fumuso *et al.*, 2003, Fumuso *et al.*, 2006, Fumuso *et al.*, 2007, Christoffersen *et al.*, 2012). Les cytokines pro-inflammatoires sont rapidement exprimées après le challenge. Différentes études ont montré une augmentation de ce type de cytokines dès 2 h post-insémination ou infection (Christoffersen *et al.*, 2012, Woodward *et al.*, 2013a). Un retard dans la mobilisation de certaines cytokines initiatrices de l'inflammation (Woodward *et al.*, 2013a) pourrait contribuer au délai dans la résolution de l'endométrite de post-saillie. Cependant, ces cytokines pro-inflammatoires peuvent également être responsables de l'exacerbation de l'inflammation. Un équilibre subtil entre la concentration des cytokines pro et anti-inflammatoires ou modulatrices est donc nécessaire dans le contrôle de la réponse inflammatoire. L'expression de l'ARNm des cytokines anti-inflammatoires augmente environ 6 h après l'exposition de l'utérus au sperme (Woodward *et al.*, 2013a). Ces cytokines inhibent l'action des cytokines pro-inflammatoires et donc les signaux de recrutement des cellules inflammatoires vers la lumière utérine, évitant ainsi une réaction inflammatoire excessive. Chez les juments susceptibles, l'expression de l'ARNm des cytokines anti-inflammatoires et modulatrices est nettement moindre 6 h après la saillie, moment qui semble d'ailleurs critique dans le développement de l'endométrite persistante de post-saillie (Woodward *et al.*, 2013a). Ainsi, chez ces juments, l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires persiste et son retour au niveau basal ou pré-insémination est plus lent que chez les juments considérées résistantes (Christoffersen *et al.*, 2012).

En parallèle à l'augmentation de cytokines, le nombre de neutrophiles augmente dans la lumière utérine, atteignant un maximum entre 4 h et 8 h post-insémination pour diminuer ensuite (Katila, 1995, Cazales *et al.*, 2020). Douze heures après, la chimiotaxie semble cesser car, bien que les neutrophiles soient encore présents, leur nombre est nettement réduit (Christoffersen *et al.*, 2012, Marth *et al.*, 2016a, Cazales *et al.*, 2020). Cependant, chez les juments susceptibles, ce nombre reste élevé pendant au moins 72 h (Christoffersen *et al.*, 2012), probablement à cause d'une chimiotaxie qui reste active, alimentant l'inflammation.

4.5 Diagnostic

Le diagnostic d'endométrite ainsi que de la susceptibilité à la développer repose sur l'historique de la jument, l'examen clinique et de l'appareil reproducteur, ainsi que sur des examens complémentaires (LeBlanc et Causey, 2009). Au vu des implications sur la reproduction équine, l'endométrite est systématiquement prise en compte dans les protocoles d'évaluation et de suivis reproductifs chez la jument. Un diagnostic précoce de ce trouble est très important pour instaurer un traitement efficace en temps opportun, ce qui permet d'augmenter les chances de gestation tout en minimisant le nombre de cycles nécessaires.

L'examen de l'appareil reproducteur, incluant l'examen du tractus reproducteur externe, du vagin et du tractus reproducteur interne par palpation transrectale (Watson, 2000), vise à identifier des facteurs prédisposant, tels qu'un dysfonctionnement des barrières anatomiques ou des anomalies conformatiⁿnelles. La présence d'une cervicite ou d'un écoulement purulent au niveau vaginal et/ou cervical peut être considérée comme un signe d'endométrite. Toutefois, ces signes ne sont pas systématiquement observés lors de l'examen (Troedsson, 2011).

L'introduction de l'échographie transrectale dans l'évaluation du tractus génital chez la jument a significativement contribué au diagnostic d'endométrite. L'accumulation de liquide utérin, visualisée par échographie transrectale, constitue la méthode diagnostique la plus utilisée actuellement en pratique (Brinsko *et al.*, 2003). Cette accumulation de liquide est considérée comme un indicateur présomptif d'endométrite ou d'un déficit de clearance mécanique de l'utérus. Bien que des techniques, telles que la scintigraphie, permettent un diagnostic plus précis, elles ne sont pas très pratiques en dehors du cadre de la recherche.

Dans les premières heures qui suivent la saillie, la présence d'une quantité modérée de liquide intra-utérin est considérée physiologique, résultant de l'inflammation qui est en cause. Cependant, au-delà des 12 h post-saillie (Troedsson, 1997), la persistance de ce liquide est un signe probable d'une endométrite non résolue. Par ailleurs, bien que des facteurs tels que l'âge ou le degré d'endomérose (Woodward *et al.*, 2012) soient utilisés pour classifier les juments en tant que susceptibles ou résistantes, c'est l'accumulation de liquide intra-utérin 96 h post-saillie qui est généralement utilisée pour le confirmer (Troedsson et Liu, 1991, Woodward *et al.*, 2012).

Introduction

La présence de liquide utérin en diœstrus, indépendamment de sa quantité ou son échogénicité, est un indicateur d'inflammation. Cela a été associé à une diminution de la fertilité par perte embryonnaire ainsi qu'au raccourcissement de la phase lutéale (Pycock, 1996). En revanche, en œstrus, la présence de liquide n'est pas toujours d'origine inflammatoire. Le transsudat vasculaire, les sécrétions glandulaires et le mucus y participent également. Néanmoins, le drainage, tant lymphatique qu'au travers du cervix, et grâce aux contractions utérines, évite son accumulation. Une petite quantité de liquide intra-utérin lors de l'œstrus et avant l'ovulation ne semble pas affecter la fertilité (Pycock, 1996, 2011). Toutefois, une accumulation de plus de 2 cm (Figure 14) a été associée à une diminution du taux de gestation. Ce critère est d'ailleurs largement utilisé en pratique chez la jument en œstrus avant la saillie, comme un indicateur présumptif de prédisposition à développer une endométrite persistante de post-saillie (Brinsko *et al.*, 2003).



Figure 14. Image échographique de l'utérus d'une jument avec une accumulation de liquide de plus de 2 cm (étoile). Source : Clinique Équine Universitaire, Université de Liège.

L'œdème endométrial, détecté par échographie, a également été suggéré comme un signe clinique d'endométrite lorsque le degré observé n'est pas en accord avec celui attendu, à savoir un œdème qui persiste 24 - 48 h après la saillie ou un hyperœdème pendant l'œstrus (Samper, 2007). L'image échographique de ce dernier est représentée par des plis endométriaux anormalement épais et une perte de l'architecture normale en « quartier d'orange » (Figure 15).

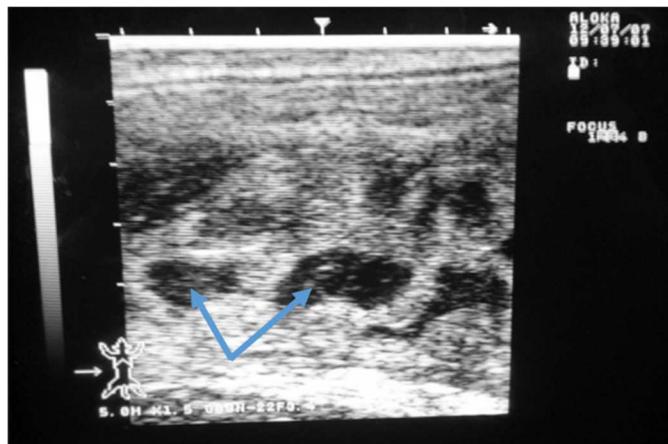


Figure 15. Image échographique de l'utérus d'une jument en œstrus avec de l'hyperœdème. Remarquer les plis endométriaux anormalement épais (flèches). Source : Clinique Équine Universitaire, Université de Liège.

La détection échographique d'une accumulation de liquide dans la lumière utérine et/ou d'une quantité inadéquate d'œdème dans les replis endométriaux chez la jument en œstrus avant la saillie est souvent utilisée sur le terrain comme outil diagnostic d'endométrite, et les juments sont donc traitées en conséquence. Néanmoins, bien que ces signes cliniques, pas toujours présents, aient été reportés comme évocateurs de la possible présence d'une inflammation et/ou de la susceptibilité à la développer, c'est la présence d'un nombre non physiologique de cellules inflammatoires, principalement de neutrophiles (Kotilainen *et al.*, 1994), qui est le signe pathognomonique confirmant le diagnostic de l'affection. La littérature montre, cependant, une grande variabilité dans les seuils considérés comme physiologiques pour le nombre de neutrophiles (Nielsen, 2005, LeBlanc *et al.*, 2007, Riddle *et al.*, 2007, Overbeck *et al.*, 2011, Kozdrowski *et al.*, 2015).

La cytologie endométriale, obtenue par frottis ou lavage utérin, est couramment utilisée sur le terrain pour confirmer une suspicion d'endométrite chez la jument (Riddle *et al.*, 2007). Cette méthode est rapide, peu coûteuse et simple à réaliser. Néanmoins, l'information que cette technique procure se limite à la présence des cellules inflammatoires dans la lumière utérine et ne permet pas de détecter les endométrites subcliniques, dans lesquelles les cellules inflammatoires se trouvent dans le tissu endométrial plutôt que dans la lumière utérine (LeBlanc et Causey, 2009).

En revanche, l'analyse histopathologique d'une biopsie utérine permet d'identifier la présence de neutrophiles et d'autres cellules inflammatoires dans la *lamina propria* et dans l'épithélium luminal. Cette méthode est considérée comme le « Gold Standard » du diagnostic d'endométrite chez la jument (Nielsen, 2005). Par ailleurs, l'histologie endométriale fournit également des informations additionnelles sur l'état global de l'utérus. Bien que cette méthode soit sûre, elle est plus invasive que la cytologie, nécessite du personnel de laboratoire spécialisé, et les résultats sont souvent tardifs par rapport à la fenêtre optimale de traitement du cycle en cours, avant ou après saillie. Par conséquent, elle n'est pas couramment utilisée sur le terrain.

Des techniques complémentaires, comme la culture bactérienne, l'examen mycologique ou l'endoscopie utérine, sont également utilisées pour aider dans le diagnostic d'endométrite chez la jument (Katila, 2016). Toutefois, certaines juments ne présentent aucun signe d'inflammation avant la saillie et rien ne laisse suspecter un déficit dans les mécanismes de résistance. Ainsi, malgré un suivi rapproché, l'endométrite reste souvent sous-diagnostiquée, ou le diagnostic est posé trop tardivement pour permettre la mise en place d'un traitement efficace. Ceci se traduit par la perte d'une éventuelle gestation, ce qui entraîne une perte financière pour le propriétaire, du temps et de ressources pour le vétérinaire, ainsi qu'un retard dans la saison de reproduction.

Pour surmonter ce problème et augmenter les taux de gestation (Knutti *et al.*, 2000), des lavages utérins après la saillie sont réalisés, avec l'objectif de diminuer la charge antigénique et les produits résultants de l'inflammation, comme traitement préventif de routine dans certaines pratiques (Katila et Ferreira-Dias, 2022). Il a été en outre reporté qu'en moins d'une décennie, le nombre de traitements intra-utérins, incluant l'usage d'antibiotiques (Allen *et al.*, 2007), a augmenté de 17 et 25 % chez des jument selon la tranche d'âge (< 8 ans et > 18 ans respectivement), sans obligatoirement avoir un diagnostic d'affection utérine au préalable, mais comme conséquence de l'âge avancé de la jument ou la non gestation (Morris et Allen, 2002, Allen *et al.*, 2007, Morris *et al.*, 2020).

De plus, une étude où la persistance de l'endométrite a été induite par occlusion du col après insémination a montré que les juments ayant souffert d'endométrite persistante de post-saillie sont plus susceptibles de récidiver au cours de la même saison (Reilas *et al.*, 2016). Par conséquent, il est important d'identifier les juments susceptibles avant la première saillie de la saison, pour pouvoir assister efficacement et de manière préventive les mécanismes de défense utérine avant que l'inflammation ne devienne pathologique. D'autant plus que de plus

en plus de juments mises tard à la reproduction, leur vie de reproductrice commençant après leur carrière sportive, ce qui augmente leur risque d'être susceptibles.

Le diagnostic d'endométrite chez la jument demeure un sujet d'actualité dans la recherche en reproduction équine. Le développement de méthodes diagnostiques peu invasives, tels que le dosage de biomarqueurs capables d'identifier les cas d'endométrite subclinique et de prédire la susceptibilité des juments, représente une perspective prometteuse. Certaines pistes ont déjà été explorées concernant des molécules tels que le lysozyme, la phosphatase alcaline, le PGF2 α , le sérum amyloïde A et certaines cytokines, qui pourraient jouer ce rôle de biomarqueur (Katila *et al.*, 1990, Nash *et al.*, 2010, Woodward *et al.*, 2013b).

Étant donné que l'endométrite est une inflammation localisée, les marqueurs sanguins ne semblent pas subir de modifications significatives en présence de cette affection (Tuppits *et al.*, 2014). L'étude des marqueurs biologiques d'origine utérine semble donc être plus pertinente. En outre, ces recherches peuvent contribuer à améliorer les connaissances sur le système immunitaire de la muqueuse utérine et à approfondir la compréhension des mécanismes inflammatoires post-saillie, ainsi que des facteurs favorisant le passage d'une inflammation physiologique transitoire à une endométrite persistante et pathologique.

5. MYÉLOPEROXYDASE

Comme décrit précédemment, la caractéristique principale de l'endométrite chez la jument est l'afflux des neutrophiles vers la lumière utérine (Kotilainen *et al.*, 1994). L'activation de ces cellules inflammatoires stimule la phagocytose des microorganismes, ce qui active les mécanismes effecteurs des neutrophiles contre les agents pathogènes.

Les neutrophiles mettent en œuvre différents mécanismes pour éliminer les pathogènes. Le premier mécanisme repose sur le métabolisme oxydatif, également appelé flambée respiratoire, via l'activation de la NADPH oxydase. Ce complexe enzymatique utilise l'oxygène pour produire l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), à partir duquel dérivent d'autres espèces réactives de l'oxygène, tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) (Witko-Sarsat *et al.*, 2000, Goldsby *et al.*, 2001, Serteyn *et al.*, 2003).

Le deuxième mécanisme, indépendant de l'oxygène, repose sur la libération de molécules antimicrobiennes contenues dans les granules des neutrophiles, dans le phagosome et/ou dans le milieu extracellulaire. Cette dégranulation libère des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, de la lactoferrine, des défensines, etc. Parmi ces granules, les granules

primaires contiennent notamment la myéloperoxydase (MPO), une enzyme jouant un rôle important dans la destruction des agents pathogènes (Witko-Sarsat *et al.*, 2000, Goldsby *et al.*, 2001, Serteyn *et al.*, 2003).

Un troisième mécanisme microbicide des neutrophiles, plus récemment identifié, est la nétose (Brinkmann *et al.*, 2004). Dans l'utérus de la jument, ce mécanisme de défense est observé lorsque les neutrophiles interagissent avec les spermatozoïdes (Alghamdi et Foster, 2005, Alghamdi *et al.*, 2009), ainsi qu'avec différentes bactéries (Rebordão *et al.*, 2014). Lors du processus de nétose, les neutrophiles libèrent des NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) qui piègent et éliminent les microorganismes dans le milieu extracellulaire. Les NETs sont composés de filaments de chromatine décondensée, à savoir de l'ADN associé à des histones, recouverts de protéines granulaires telles que l'élastase, la protéinase 3, la cathepsine G et la MPO (Brinkmann *et al.*, 2004).

La MPO est une peroxydase hémique appartenant à la famille des peroxydases des mammifères, incluant également la peroxydase thyroïdienne, l'éosinophile peroxydase et la lactoperoxydase. Ces enzymes présentent une homologie structurelle significative entre elles (Serteyn *et al.*, 2003). L'enzyme mature est un homodimère symétrique, constitué de 2 hém-enzymes, chacune composée de deux sous-unités : une chaîne légère d'environ 15 kDa et une chaîne lourde d'environ 60 kDa (Mathy-Hartert *et al.*, 1998, Nauseef *et al.*, 2000, Franck *et al.*, 2005) (Figure 16). La MPO est le seul membre de la famille des peroxydases des mammifères qui existe sous forme de dimère mature, bien que chaque hém-MPO soit enzymatiquement active (Kargapolova *et al.*, 2021).

La MPO est contenue en grandes quantités dans les granules azurophiles ou primaires des neutrophiles (Schultz et Kaminker, 1962). Une fois libérée, elle agit de concert avec la flambée respiratoire pour produire des espèces oxydantes, des molécules instables et réactives, qui sont très puissantes et toxiques pour de nombreux pathogènes. Bien que le H_2O_2 produit par la flambée respiratoire soit un agent bactéricide très efficace, la MPO amplifie son potentiel toxique en l'utilisant comme substrat principal pour ses activités de peroxydase et/ou d'halogénéation, ce qui conduit à la production d'espèces réactives impliquées dans des processus de chloration, de nitration et d'oxydation (Serteyn *et al.*, 2003, Saed *et al.*, 2010) (Figure 17).

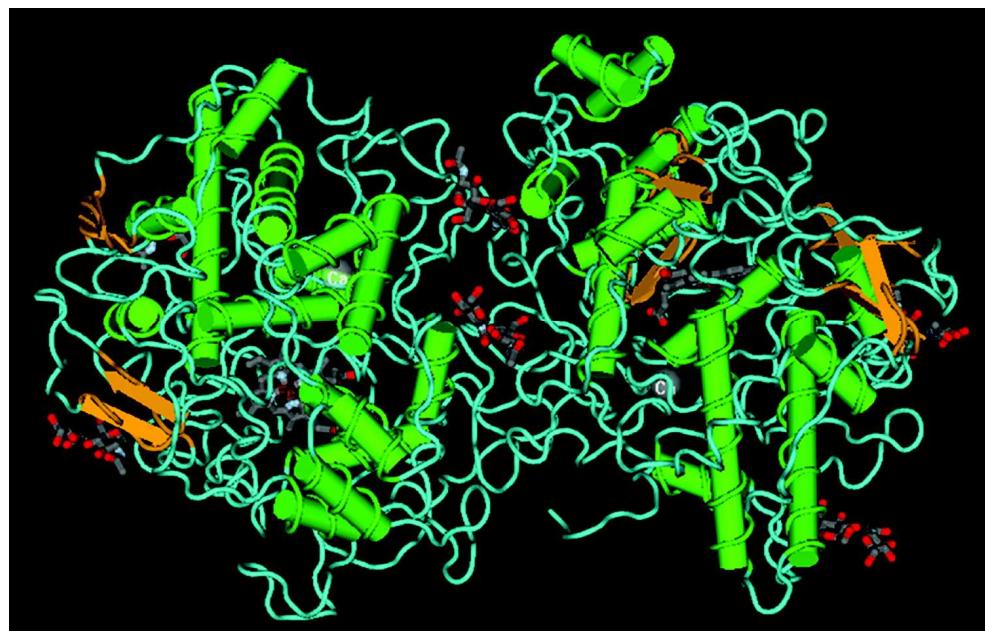


Figure 16. Structure tridimensionnelle de l'homodimère de la myéloperoxydase (Van Der Veen *et al.*, 2009).

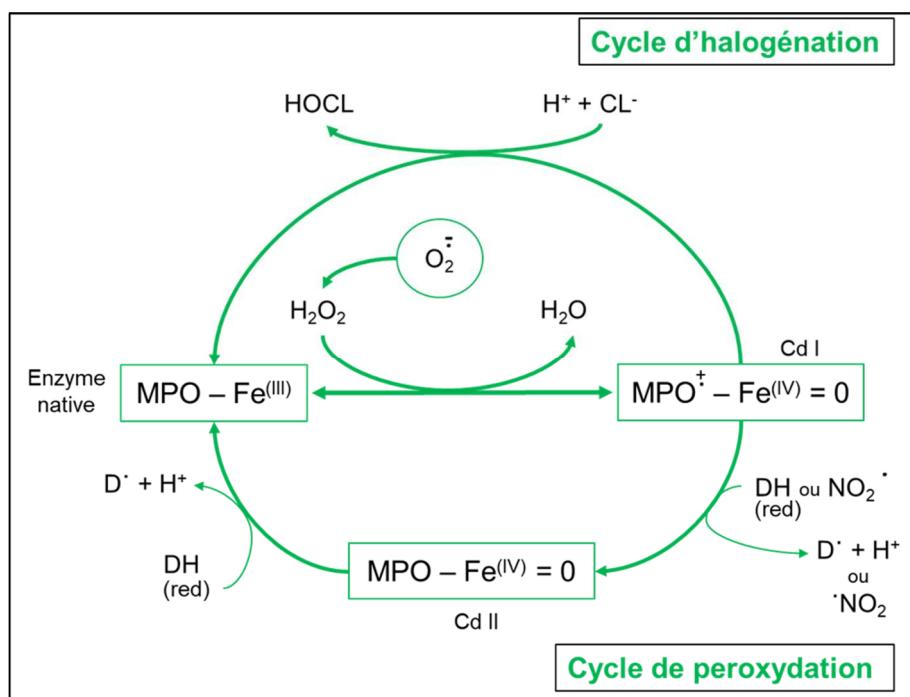


Figure 17. Cycle d'halogénéation et de peroxydation de la myéloperoxydase (d'après (Serteyn *et al.*, 2003) – modifiée).

La MPO catalyse l'oxydation des ions halogénures ainsi que du pseudo-halogénure thiocyanate (SCN^-), notamment via son cycle d'halogénéation, entraînant la production des agents oxydants et halogénants. La réaction catalytique de la MPO dépend de la disponibilité des substrats et du pH (Furtmüller *et al.*, 1998). À pH neutre, le SCN^- est le substrat privilégié de la MPO (Dalen *et al.*, 1997, Furtmüller *et al.*, 1998). Bien que le SCN^- soit omniprésent dans le liquide extracellulaire des mammifères à des concentrations variables, dans le plasma, il est présent à des niveaux faibles, qui dépendent principalement de l'alimentation (Dastur *et al.*, 1972, Rehak *et al.*, 1997). En revanche, dans les sécrétions des muqueuses, les concentrations en SCN^- sont plus élevées (Chandler et Day, 2015), et il y constitue le principal substrat du système d'halogénéation.

La réaction MPO- H_2O_2 - SCN^- aboutit à la production d'acide hypothiocyanique (HOSCN), un microbicide efficace mais ayant une capacité oxydante inférieure à celle des autres produits dérivés de peroxydases (Davies *et al.*, 2008). Cependant, à concentration plasmatique physiologique, l'ion chlorure (Cl^-) reste le substrat le plus abondant pour la MPO dans le plasma et constitue l'un des principaux éléments impliqués dans le cycle d'activité de cette enzyme (Furtmüller *et al.*, 1998).

Ce substrat permet la production d'acide hypochloreux (HOCl), un oxydant puissant capable d'oxyder et de chlorer de nombreuses molécules, qui est reconnu pour ses propriétés bactéricides (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). L'HOCl est généralement associé à des effets délétères de la MPO sur les tissus et les organes (Davies et Hawkins, 2020).

La MPO est également considérée comme un marqueur d'activation des neutrophiles. En médecine humaine, elle est étudiée dans différentes maladies en tant que marqueur inflammatoire et, en fonction de l'évolution des concentrations mesurées dans le sang, elle peut être considérée comme un possible indicateur pronostique de certaines maladies (Siraki, 2021). Le dosage immunologique de la MPO sous forme totale, tel que réalisé par des tests de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Franck *et al.*, 2005), est considéré comme un marqueur d'infiltration neutrophile et de dégranulation. Ce type de test renseigne sur l'abondance de la molécule, qu'elle soit sous sa forme native, son précurseur ou sa forme dégradée. Toutefois, il ne permet pas de mesurer l'activité enzymatique réelle de la MPO, définie comme étant sa capacité à produire des agents oxydants. Un test immunologique, le SIEFED (*Specific Immunologic Extraction Followed by Enzymatic Detection*), a été développé par Franck *et al.* afin de quantifier spécifiquement la fraction active de l'enzyme présente dans les liquides biologiques équins (Franck *et al.*, 2006) et humains (Franck *et al.*, 2009).

Introduction

Chez le cheval, la MPO a déjà été étudiée dans de nombreux liquides biologiques et tissus, et une concentration excessive a souvent été associée à divers troubles inflammatoires des systèmes digestif, respiratoire et locomoteur dont la fourbure (Art *et al.*, 2006a, Art *et al.*, 2006b, Grulke *et al.*, 2008, Wauters *et al.*, 2013, Salciccia *et al.*, 2016, Storms *et al.*, 2022). Dans le domaine de la reproduction équine, la MPO a été principalement étudiée dans le sperme (Ponthier *et al.*, 2008, Ponthier *et al.*, 2009, Ponthier *et al.*, 2010, Ponthier *et al.*, 2012, Ponthier *et al.*, 2014). Ponthier *et al.* ont observé qu'en l'absence de neutrophiles, l'enzyme se trouve en grande concentration dans le sperme frais chez l'étalon (Ponthier *et al.*, 2014). Une fois le sperme centrifugé, la majeure partie de la MPO se retrouve dans le surnageant, mais sous une forme non active, tandis que dans le culot riche en cellules, la concentration de MPO est plus faible tout en présentant une activité enzymatique plus importante.

Dans les travaux sur le sperme équin, l'origine de cette MPO n'a pas pu être démontrée (Ponthier, 2012). La présence des neutrophiles dans le sperme était insignifiante.

Néanmoins, en accord avec ce qui a été récemment décrit pour d'autres cellules non myéloïdes (Green *et al.*, 2004, Roumeguère *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2015, Martínez-Marcos *et al.*, 2019), il a été observé que des cellules non-spermatiques, autres que les neutrophiles, contenaient de la MPO. Ces cellules étaient principalement des cellules épithéliales et des débris cellulaires qui, selon les auteurs, auraient capté la MPO du milieu extracellulaire après libération par les neutrophiles (Ponthier *et al.*, 2012).

En effet, certaines cellules non-inflammatoires semblent pouvoir capturer la MPO tant du milieu extracellulaire (Yang *et al.*, 2001, Haegens *et al.*, 2008) que par contact direct avec les neutrophiles (Jerke *et al.*, 2013). De plus, il semble de plus en plus reconnu que certaines cellules peuvent la synthétiser *de novo*. Pendant longtemps, il a été admis que l'expression génique de la MPO, et par conséquent sa biosynthèse, était exclusivement associée à des précurseurs myéloïdes (Austin *et al.*, 1996). Néanmoins, bien que la MPO soit principalement contenue dans les neutrophiles, la capacité des cellules non myéloïdes à exprimer la MPO endogène a été démontrée dans les cellules de l'appareil reproducteur chez le bétail (Martínez-Marcos *et al.*, 2019), dans des neurones humains en conditions physiologiques (Green *et al.*, 2004), et chez des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Green *et al.*, 2004), ainsi que dans les cellules endothéliales humaines en réponse au stress oxydatif (La Rocca *et al.*, 2009).

Au niveau de l'utérus, différentes études chez la souris et la rate ont considéré la concentration de MPO dans le tissu endométrial comme marqueur d'infiltration et d'activation des neutrophiles, afin d'étudier l'effet de différentes molécules sur les fonctions des neutrophiles et sur la régulation de la réaction inflammatoire (Alataş *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2017). Malgré le fait que la principale source de MPO soit les neutrophiles, dont la présence dans l'utérus de la jument est un signe sans équivoque d'endométrite, il semble, à notre connaissance, que la MPO n'ait pas encore été étudiée dans l'utérus de la jument, à l'exception de deux études très récentes portant sur le protéome endométrial chez les juments atteintes d'une endométrite infectieuse avant saillie (Da Silva *et al.*, 2024) et celles présentant une endométrite persistante ou infectieuse post-saillie (Teixeira-Soares *et al.*, 2025). Une autre étude a également exploré la MPO en tant que composant des NETs en réponse à des infections bactériennes (Rebordão *et al.*, 2014).

La MPO est un bactéricide très puissant (Serteyn *et al.*, 2003) qui, paradoxalement et via les mêmes mécanismes, peut être à l'origine, ou du moins associée, au développement de certaines maladies inflammatoires et fibrotiques dans divers organes (Rudolph *et al.*, 2010, Friedrichs *et al.*, 2012, Pulli *et al.*, 2015, Khan *et al.*, 2018). Malgré son rôle protecteur, lorsqu'elle est surabondante ou libérée en grande quantité dans le milieu extracellulaire, les capacités oxydantes des produits de la MPO peuvent être néfastes pour les cellules et tissus hôtes (Klebanoff, 2005). Par ailleurs, il a été suggéré que dans l'utérus, la MPO pourrait jouer un rôle dans le développement de la fibrose endométriale, ou endomérose, chez la jument, car l'enzyme a été associée à la transcription du collagène de type I dans des explants d'endomètre équin (Rebordão *et al.*, 2018, Rebordão *et al.*, 2021). De plus, l'inhibition *in vitro* de son activité enzymatique diminue l'effet profibrotique sur l'endomètre (Amaral *et al.*, 2021).

Objectifs de la recherche

PROBLEMATIQUE

L'endométrite est recensée comme le troisième problème médical le plus fréquent chez les chevaux adultes et constitue une cause majeure d'infertilité chez la jument. Bien que son diagnostic, ainsi que l'identification des juments susceptibles de développer une endométrite persistante de post-saillie, aient fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine de la reproduction équine, cette affection reste souvent sous-diagnostiquée, ou le diagnostic est posé trop tardivement pour permettre la mise en place d'un traitement efficace. Actuellement, dans le cadre de la recherche de nouvelles méthodes diagnostiques, l'identification de biomarqueurs inflammatoires potentiels semble être une option très prometteuse.

En médecine humaine, la concentration en MPO est étudiée dans diverses situations pathologiques comme marqueur inflammatoire. La MPO est considérée comme un indicateur de l'activation des neutrophiles, qui la contiennent et la libèrent. Chez le cheval, une concentration excessive de MPO mesurée dans divers liquides biologiques et tissus a été associée à diverses maladies inflammatoires. Cependant, au moment où nous avons entamé notre étude, la MPO n'avait jamais été étudiée dans l'utérus de la jument, malgré le fait avéré que la présence de neutrophiles dans la lumière utérine et/ou le tissu endométrial constitue un signe pathognomonique d'endométrite chez cette espèce.

OBJECTIFS

Au début de cette thèse, nous avons entrepris d'étudier la concentration de MPO totale dans le liquide des lavages utérins comme biomarqueur inflammatoire, pour le diagnostic de l'endométrite chez la jument et de la susceptibilité individuelle à la développer.

Ainsi, les objectifs initiaux étaient les suivants :

- *Identifier la présence éventuelle de MPO dans les sécrétions utérines de juments cyclées et en déterminer la concentration.*
- *Comparer les concentrations de MPO entre des juments atteintes d'endométrite clinique et des juments saines.*
- *Établir un seuil entre les concentrations utérines physiologiques et pathologiques en MPO chez la jument, afin de pouvoir en faire un outil pratique pour la gestion de l'élevage.*
- *Étudier la relation potentielle entre les concentrations en MPO et la susceptibilité des juments à développer une endométrite persistante de post-saillie.*

Cependant, les résultats préliminaires obtenus lors de notre première étude publiée en 2014, ont révélé des éléments inattendus. La MPO n'était pas obligatoirement associée à la présence des neutrophiles. Chez les juments saines, la présence de MPO était également détectée dans tous les échantillons à des concentrations très variables.

Ces observations ont conduit à une réévaluation de l'objectif initial. Dans ce contexte, nous avons jugé pertinent d'étudier la MPO en conditions physiologiques, avec pour objectif de la caractériser dans l'utérus de la jument ainsi que d'explorer son rôle potentiel dans les mécanismes de défense de la muqueuse endométriale, avant d'envisager son utilisation comme méthode diagnostique d'endométrite

Ainsi, les objectifs redéfinis étaient les suivants :

- *Étudier la MPO dans le liquide utérin en l'absence d'inflammation et évaluer la dynamique de sa concentration en fonction du cycle oestral, ainsi que lors de l'anœstrus saisonnier.*
- *Identifier l'origine de la MPO présente dans le liquide utérin en l'absence de neutrophiles et étudier l'influence possible du cycle reproducteur.*

Objectifs de la recherche

- *Évaluer l'activité enzymatique de la MPO présente dans le liquide utérin des juments en œstrus, diœstrus et lors de l'ancœstrus saisonnier en conditions physiologiques, afin déterminer si la présence de MPO pourrait avoir un effet néfaste pour l'endomètre.*
- *Examiner l'impact de la fibrose endométriale sur la MPO utérine, avec l'hypothèse que cette condition pathologique pourrait altérer la capacité de résilience de l'endomètre.*

Présentation d'études

Section expérimentale

Étude 1

**Des concentrations élevées de myéloperoxydase utérine
comme indicateur d'endométrite chez la jument**

Theriogenology 2014, 81(7): 936-940

Parrilla Hernández S, Ponthier J, Franck T, Serteyn D, Deleuze S

1.1 Introduction

Malgré plus de 50 ans de recherches consacrées à cette affection (Knudsen, 1964), l'endométrite demeure l'une des principales causes d'infertilité chez la jument. L'efficacité de sa prise en charge thérapeutique repose sur un diagnostic précoce et fiable, ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués. Une telle compréhension est essentielle pour améliorer la prise en charge des juments susceptibles de développer une endométrite et augmenter leur taux de gestation.

Dans ce contexte, cette première étude visait à explorer le potentiel de la MPO dans le liquide utérin comme biomarqueur diagnostique d'endométrite chez la jument. Le premier objectif était de mettre en évidence la présence de la MPO dans la lumière utérine et de mesurer sa concentration dans le liquide utérin chez la jument. Le deuxième objectif était d'examiner la relation entre la MPO et l'endométrite, ainsi que ses signes cliniques associés, et d'établir, le cas échéant, un seuil diagnostique potentiel pour la MPO en tant que biomarqueur.

1.2 Matériel et Méthodes

1.2.1 Juments et prélèvements

Cette étude a été réalisée sur des juments présentées au Centre de Reproduction Équine Linalux-MLS entre avril 2011 et janvier 2013, dans le cadre d'un programme commercial d'insémination artificielle avec du sperme frais ou congelé, sans interférer avec la procédure normale de suivi et d'insémination. Tous les échantillons ont été obtenus avant insémination lors d'un examen complet de routine de l'appareil génital. Le diagnostic de gestation a été effectué systématiquement par échographie au 14^{ème} jour après ovulation. Cinquante-et-une juments Arabes, Cheval de sang, Lusitanien, Quarter Horse et Cheval de trait, âgées de 5 à 23 ans (moyenne : 13,4 ans) ont été incluses dans l'étude. Un total de 69 cycles a été exploité. Les juments en œstrus ont été régulièrement échographiées jusqu'à ce qu'un follicule supérieur à 35 mm soit observé, moment auquel tous les échantillons et les données ont été récoltés.

Des frottis et des lavages utérins ont été réalisés chez toutes les juments. Après un nettoyage de la vulve et du périnée, un écouvillon utérin (Equivet ; Kruuse, Marselv, Danemark) ou une brosse cytologique utérine (Minitüb, Tiefenbach, Allemagne) à double protection a été introduit dans l'utérus par voie vaginale, et un échantillon cytologique de l'endomètre a été obtenu et

étalé sur une lame en verre. Les lames cytologiques ont été séchées à l'air ambiant et colorées avec Diff-Quick® (RAL, Martillac, France).

Un lavage utérin à faible volume (60 ml) avec du Lactate de Ringer a été effectué à l'aide d'une pipette d'insémination stérile (Minitüb) moyennant la technique du double gant stérile. Après massage de l'utérus, le liquide a été réaspiré. Pour des raisons techniques, certains prélèvements ont été récoltés dans des tubes EDTA ($n = 26$), tandis que d'autres ont été prélevés dans des tubes secs ($n = 38$). Afin de valider l'analyse, cinq échantillons ont été prélevés simultanément dans les deux types de tubes. Les échantillons ont été immédiatement centrifugés à 600 g pendant 10 minutes. Les surnageants obtenus après centrifugation ont été collectés dans des tubes de 2 ml et conservés à - 20°C jusqu'à l'analyse de la MPO.

1.2.2 Liquide intraluminal et grade d'œdème

La quantité de liquide intraluminal a été mesurée par échographie. Une hauteur de liquide supérieure à 1 cm a été considérée comme anormale pour l'analyse statistique. L'œdème a été classé avec un système de notation subjective légèrement modifié par rapport à une description précédente (Samper, 2009) (Figure 1.1).

1.2.3 Cytologie

Un minimum de 10 champs a été évalué au microscope par le même examinateur. Le nombre de neutrophiles par champ a été utilisé pour évaluer le degré d'inflammation. Pour l'analyse statistique et comme cela a été décrit précédemment (Purswell *et al.*, 1989, LeBlanc et Causey, 2009), une moyenne d'un ou plusieurs neutrophiles par champ, observée à un grossissement de 400x, a été considérée comme un signe d'inflammation.

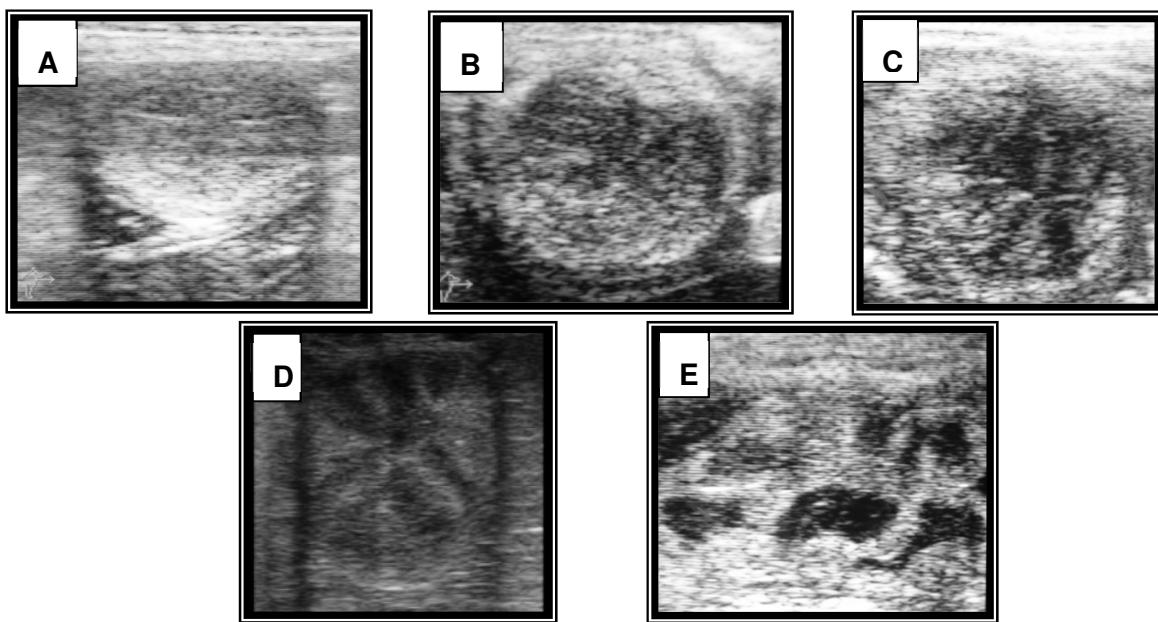


Figure 1.1. Degré d'œdème endométrial chez la jument : **A)** Grade 0 : absence d'œdème ; **B)** Grade I : les plis utérins sont difficiles à identifier ; **C)** Grade II : certains plis de l'endomètre peuvent être identifiés et le col de l'utérus a l'apparence d'une arête de poisson ; **D)** Grade III : les plis endométriaux sont facilement identifiables avec des bords hyperéchogènes et des centres hypoéchogènes (aspect en « quartier d'orange ») ; **E)** Grade IV pour les juments atteintes d'hyperœdème : les plis endométriaux sont anormalement épais et l'architecture normale en « quartier d'orange » est perdue.

1.2.4 Dosage de la myéloperoxydase

La concentration de MPO dans le surnageant a été déterminée à l'aide d'un kit ELISA commercial spécifique à la MPO équine (Bioptris SA, Liège, Belgique) (Franck *et al.*, 2005). L'anticorps primaire (IgG de lapin anti-MPO) a été fixé au fond des puits de microplaques (Cliniplate EB ; Thermo Labsystems, Helsinki, Finlande). Des échantillons de concentrations standards de MPO équine (0 ; 1,015 ; 2,03 ; 4,06 ; 8,12 ; 16,25 ; 32,5 et 65 ng/ml) ainsi que les surnageants des lavages utérins dilués à 50x et 200x (100 µl) ont été ajoutés dans les puits. Les microplaques ont été incubées à 4°C pendant la nuit, puis lavées avec une solution physiologique contenant 0,1 % de Tween 20 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Les complexes anticorps-anticorps immobilisés ont ensuite été incubés pendant 2 h à 37°C avec l'anticorps secondaire (IgG de cobaye anti-MPO équine) marqué à la phosphatase alcaline. Après un nouveau lavage, l'activité phosphatase a été déterminée en incubant les complexes anticorps-anticorps avec une solution stabilisée de phosphate de paranitrophényle pendant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité. La réaction a été arrêtée par l'ajout d'une solution

à 2,5M de NaOH, et l'absorbance a été mesurée à 405 nm avec le lecteur de plaque Multiscan Ascent Plate ReaderTM (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlande). L'absorbance était directement proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline liée à l'anticorps secondaire anti-MPO, reflétant la concentration de MPO capturée par l'anticorps primaire. Chaque échantillon a été testé en double, et la moyenne des deux valeurs a été utilisée. Lorsque des valeurs de MPO ont été obtenues aux deux dilutions (50x et 200x) d'un même échantillon, la moyenne des résultats a été calculée et prise en compte. Le coefficient de variation (CV) intra essais moyen était de $14,92 \pm 13,15 \%$, avec 74 % des échantillons présentant un CV inférieur à 14,92 %. Les échantillons ayant un CV supérieur à 20 % correspondaient aux valeurs proches des limites de détection de la courbe d'étalonnage. Malgré la double dilution des échantillons, certains sont restés en dehors de la courbe d'étalonnage et ont été classés comme ayant une concentration de MPO supérieurs à 7000 ng/ml, ce qui représente la limite supérieure de détection du test.

1.2.5 Analyses statistiques

Pour les données discontinues, telles que la présence de liquide utérin, l'hyperœdème, la gestation et la cytologie, le test exact de Fisher a été utilisé pour déterminer la signification du tableau de contingence. La distribution normale des paramètres a été vérifiée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. Étant donné que les valeurs ne suivaient pas une distribution normale, les résultats ont été exprimés en médianes. Les médianes de concentration de MPO ont été comparées entre les groupes à l'aide du test de Mann-Whitney. Pour comparer les résultats obtenus sur tubes EDTA et sur tubes secs, un test de rangs signés de Wilcoxon apparié a été utilisé, ce test étant non paramétrique. La significativité statistique a été fixée à une valeur $p < 0,05$.

1.3 Résultats

1.3.1 Hyperœdème, liquide intraluminal et cytologie

Au total, 69 cycles ont été étudiés. Pour ces cycles, les résultats de la cytologie, ainsi que la présence d'œdème excessif et de liquide intraluminal, sont résumés dans le Tableau 1.1. Une association significative a été observée entre la présence de liquide utérin libre et le résultat de la cytologie ($p = 0,0125$). Aucune autre relation statistiquement significative n'a été trouvée entre les autres paramètres étudiés.

Tableau 1.1. Résultats de la cytologie, présence d'œdème excessif et de liquide intraluminal pour les cycles étudiés.

| | Cytologie + | Cytologie - | Liquide + | Liquide - |
|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|
| Hyperœdème | 2 (3%) | 19 (28%) | 3 (4%) | 18 (26%) |
| Œdème normal | 6 (9%) | 42 (61%) | 7 (10%) | 41 (59%) |
| Liquide + | 4 (6%) | 6 (9%) | | |
| Liquide - | 4 (6%) | 55 (80%) | | |

Cytologie + : ≥ 1 neutrophile/champ; Cytologie - : < 1 neutrophile/champ ; Liquide + : $> 1\text{cm}$; Liquide - : $\leq 1\text{cm}$.

1.3.2 Concentration en myéloperoxydase

Aucune différence significative n'a été observée ($p = 0,4375$) entre la concentration de MPO des échantillons prélevés dans des tubes EDTA et ceux prélevés dans des tubes secs ($n = 5$ pour chaque méthode). Par conséquent, les résultats des échantillons prélevés dans des tubes EDTA ($n = 26$) et dans de tubes secs ($n = 38$) ont été regroupés pour l'analyse des données. La MPO a été détectée dans tous les lavages utérins. La concentration de l'enzyme variait entre les cycles, avec des valeurs allant de 10,06 à >7000 ng/ml, la limite supérieure de détection du dosage. La concentration médiane globale de MPO était de 1617,860 ng/ml. Les concentrations de MPO (médianes) en relation avec les différents paramètres étudiés sont présentés dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.2. Concentrations médianes de myéloperoxydase (ng/ml) dans les lavages utérins en fonction des paramètres cliniques étudiés.

| | Positive | Négative |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Cytologie | 7000 ^a (899,335 → 7000) | 1128,7 ^b (10,060 → 7000) |
| Hyperœdème | 1121,9 (10,060 → 7000) | 1617,9 (13,93 → 7000) |
| Liquide utérin | 7000 ^c (50,815 → 7000) | 1436,8 ^d (10,060 → 7000) |
| Gestation | 1099,6 (21,055 → 7000) | 2552,3 (13,93 → 7000) |

Les valeurs avec un exposant différent dans la même ligne sont statistiquement différentes $p < 0,05$.

En général, les juments atteintes d'endométrite présentaient des concentrations de MPO plus élevées dans les surnageants des lavages utérins ($p = 0,0087$) que celles des juments avec une cytologie négative. Bien que certains résultats cytologiques négatifs aient été associés à des concentrations élevées en MPO, l'inverse (c'est-à-dire de petites quantités de MPO dans les liquides utérins de juments atteintes d'endométrite) n'a pas été observé. Des concentrations de MPO significativement plus élevées ont été observées chez les juments présentant une accumulation anormale de liquide utérin libre ($p = 0,0367$). Parmi 10 cycles où plus de 1 cm de liquide a été observé, seulement un cycle était associé à une faible quantité de MPO. En revanche, les échantillons considérés comme exempts de liquide présentaient des valeurs de MPO variables.

Les concentrations de MPO dans le lavage utérin des juments présentant un hyperœdème en œstrus étaient également très variables, mais n'ont montré aucune différence statistique ($p = 0,6382$) par rapport aux juments ayant un degré d'œdème normal (du grade I au III).

1.3.3 Gestation

Aucune association n'a été observée entre le diagnostic de gestation et la présence de liquide, d'hyperœdème ou de résultats cytologiques positifs. Bien que les cycles sans gestation (54,2 %) aient montré des niveaux de MPO plus élevés, aucune différence statistiquement significative n'a été constatée ($p = 0,0917$).

1.4 Discussion

La détection par échographie du liquide intraluminal est couramment utilisée comme outil de diagnostic de l'endométrite (Brinsko *et al.*, 2011b). Ce signe clinique a été rapporté comme étant un indicateur d'endométrite (Mckinnon *et al.*, 1988, Burleson *et al.*, 2010), ce qui est soutenu par l'association observée, dans la présente étude, entre le liquide utérin et la présence de cellules inflammatoires. Cependant, le diagnostic ne peut pas reposer uniquement sur la présence de ce signe clinique, car certaines juments en œstrus peuvent présenter du liquide intraluminal sans qu'il y ait d'inflammation associée (Pycock, 1996, LeBlanc, 2010).

La présence d'un œdème endométrial excessif après la saillie (Samper, 2007, LeBlanc et Causey, 2009) et pendant la phase de l'œstrus (Samper, 2009) a également été considérée comme un indicateur potentiel de pathologie utérine. Dans une étude, l'hyperœdème avait été associé à des cytologies positives dans 56,9 % des cas (Samper, 2007). Cette étude

considérait les juments comme ayant un œdème excessif soit lorsqu'il était observé au moment de la saillie, soit lorsque l'œdème normal ne régressait pas 48 h après la saillie. Les cytologies positives étaient en partie liées à des cas d'endométrite de post-saillie. Cependant, dans notre étude, seulement 3 % des juments présentant un hyperœdème étaient également positives à la cytologie, et aucun lien significatif entre ces paramètres n'a été observé. Une partie de cette divergence pourrait être attribuée à des résultats cytologiques faussement négatifs (Nielsen, 2005, Riddle *et al.*, 2007, LeBlanc et Causey, 2009).

Cependant, étant donné que les données sur la cytologie et le degré d'œdème ont été collectées lorsque les juments présentaient un follicule de 35 mm (c'est-à-dire avant la saillie), nos résultats suggèrent que l'hyperœdème au début de l'œstrus n'est pas associé à l'endométrite. Bien qu'une endométrite préexistante expliquant l'hyperœdème avant la saillie ne puisse être exclue, d'autres causes non inflammatoires pourraient expliquer l'hyperœdème. Un drainage utérin altéré en raison d'une incompétence cervicale (LeBlanc, 2008), une réponse vasculaire excessive aux œstrogènes, une pathologie lymphatique ou une activité myoélectrique altérée (Troedsson, 1999, LeBlanc et Causey, 2009), peuvent également être responsables de cet œdème excessif. Samper a associé l'hyperœdème endométrial à la présence de liquide utérin (Samper, 2007). Toutefois, cette observation n'a pas été corroborée par nos résultats ni par d'autres études similaires dans la littérature. Il est plausible que la détection du liquide intraluminal en présence d'un œdème excessif dépende de la sévérité du déficit de drainage responsable de l'œdème.

Les résultats des échantillons prélevés dans des tubes EDTA et dans des tubes secs ont été considérés indifféremment, car les concentrations de MPO des échantillons récoltés dans les deux types de tubes n'ont montré aucune différence significative. L'EDTA a été décrit comme le meilleur conditionnement pour maintenir une concentration stable de MPO dans les échantillons de sang, en prévenant la coagulation sanguine qui pourrait stimuler la dégranulation et la destruction partielle des neutrophiles (Deby-Dupont *et al.*, 1998). Cependant, nous pouvons supposer que la nature de nos échantillons (lavage utérin versus sang) ainsi que la centrifugation immédiate ont permis d'éviter une dégranulation significative supplémentaire des neutrophiles et en conséquence une altération des concentrations de MPO mesurées.

La MPO a été détectée dans les lavages utérins de toutes les juments en œstrus, suggérant une présence physiologique de MPO au cours cette phase du cycle. À notre connaissance, ceci est la première fois que la présence de MPO dans la lumière utérine des juments a été rapportée. Les concentrations de MPO observées dans l'utérus équin se sont révélées très

variables. Les valeurs minimales étaient inférieures aux concentrations plasmatiques observées chez des chevaux sains (169,7 ng/ml) (Art *et al.*, 2006a), tandis que les valeurs maximales dépassaient celles relevées dans les lavages broncho-alvéolaires des chevaux pathologiques (500 ng/ml) (Art *et al.*, 2006b), et les concentrations plasmatiques mesurées chez des chevaux souffrant de coliques impliquant un étranglement du gros intestin (1169,46 ng/ml) (Grulke *et al.*, 2008).

La MPO dans le sperme équin congelé a été rapportée à des niveaux très élevés (19050 ng/ml) (Ponthier *et al.*, 2009). Cependant, dans notre étude, les concentrations de MPO dans la lumière utérine ne peuvent pas être comparées à ces résultats, car aucune dilution supplémentaire n'a été effectuée pour obtenir des valeurs définies, et les concentrations élevées ont été enregistrées comme étant supérieures à 7000 ng/ml. Les juments présentant une cytologie positive avaient des concentrations de MPO significativement plus élevées, ce qui n'est pas surprenant, car la MPO, contenue et libérée par les neutrophiles (Serteyn *et al.*, 2003), est impliquée dans la réaction inflammatoire. Néanmoins, certaines juments avec une cytologie négative présentaient également des concentrations élevées en MPO. Ces résultats pourraient être la conséquence de faux négatifs, souvent associés à l'utilisation d'écouvillons utérins de type coton-tige (Daspet *et al.*, 2010, Overbeck *et al.*, 2011). De plus, certains agents pathogènes semblent induire une réponse neutrophilique aiguë limitée (Riddle *et al.*, 2007), et dans les cas d'endométrite subclinique, les neutrophiles se trouvent dans les couches plus profondes de l'endomètre pouvant expliquer les prélèvements cytologiques négatifs. Une approche similaire avec des biopsies utérines, considérées comme le "Gold Standard" du diagnostic de l'endométrite (Nielsen, 2005) devrait être envisagée pour pallier cette limitation. Par ailleurs, il est possible que ces niveaux élevés de MPO soient le reflet d'une inflammation endométriale antérieure. En effet, une libération retardée de la MPO, après sa capture par des cellules non inflammatoires, a été suggérée (Ponthier *et al.*, 2012, Ponthier *et al.*, 2013).

Comme mentionné précédemment, la présence de liquide intraluminal est un outil utilisé pour le diagnostic de l'endométrite (Brinsko *et al.*, 2011b). Dans notre étude, une relation statistiquement significative ($p = 0,0367$) entre l'accumulation de liquide et la concentration de MPO a été observée, confirmant que ces deux paramètres sont des marqueurs de l'inflammation de l'endomètre. À l'inverse, l'hyperœdème n'était associé ni à une cytologie positive, ni à la présence de liquide intraluminal, ni à la concentration de MPO, ce qui suggère qu'il ne devrait pas être considéré comme un indicateur d'endométrite. La relation entre l'affection utérine et la concentration de MPO mérite toutefois d'être approfondie afin de définir

un seuil précis entre les concentrations physiologiques et pathologiques de MPO dans les lavages utérins. Aucun des paramètres étudiés n'a eu d'impact sur le diagnostic de gestation. Toutes les juments incluses dans cette étude faisaient partie d'un programme d'élevage commercial et ont bénéficié d'une gestion et de traitements intensifs, ce qui pourrait avoir contribué à améliorer le taux de gestation malgré l'état de l'utérus.

1.5 Conclusion

En conclusion, cette étude rapporte pour la première fois la présence de MPO dans la lumière utérine chez la jument. La MPO est présente chez toutes les juments en œstrus, en quantité variable, et ce, indépendamment de la détection ou non de neutrophiles. Ce résultat inattendu suggère l'hypothèse d'un rôle physiologique de la MPO dans l'utérus de la jument dans cette phase du cycle, non associé à la réponse inflammatoire. L'origine non inflammatoire de la MPO ainsi que sa possible présence dans le liquide utérin pendant les autres phases du cycle reproducteur demeurent encore inconnues. Comme attendu, les concentrations de MPO étaient plus élevées en présence d'endométrite. Néanmoins, des cytologies négatives ont également été associées à des concentrations élevées de MPO, ce qui devrait être investigué en utilisant la biopsie endométriale comme la méthode de référence pour diagnostiquer l'inflammation et limiter le risque des faux négatifs. Des concentrations élevées en MPO, ainsi que l'accumulation de liquide intraluminal, mais pas l'œdème excessif, pourraient être des indicateurs d'une inflammation endométriale. Cependant, cette étude n'a pas permis d'établir un seuil entre les concentrations utérines physiologiques et pathologiques de MPO chez la jument, pour pouvoir en faire un outil pratique dans la gestion de l'élevage.

Section expérimentale

Étude 2

Caractérisation de la myéloperoxydase dans l'endomètre équin sain

Animals 2023, 13(3): 375

Parrilla Hernández S, Franck T, Munaut C, Feyereisen E, Piret J, Farnir F, Reignier F,
Barrière P, Deleuze, S

2.1 Introduction

Les résultats obtenus au terme de notre première étude suggèrent une présence constitutive de MPO dans l'utérus chez la jument en œstrus, indépendante de l'activation neutrophilique associée aux processus inflammatoires. Bien que l'origine de la MPO ait toujours été exclusivement associée aux cellules myéloïdes, en particulier aux neutrophiles (Austin *et al.*, 1996), sa détection dans la lumière utérine en absence d'inflammation suggère une origine différente et évoque un possible rôle physiologique dans le système immunitaire de la muqueuse endométriale.

Par ailleurs, la présence constante de MPO détectée dans l'utérus des juments soulève la question d'une éventuelle action pathologique de l'enzyme dans l'endomètre et de son association avec différentes affections endométriales équines.

Ces observations nous ont conduits à approfondir l'étude de la MPO dans l'utérus de la jument en conditions physiologiques, une étape qui, rétrospectivement, aurait dû précéder l'investigation de son rôle physiopathologique. En effet, la compréhension des mécanismes physiologiques constitue un préalable indispensable à l'étude des processus pathologiques. Cette deuxième étude visait ainsi à caractériser la présence, l'activité enzymatique et la localisation de la MPO dans l'utérus des juments au cours des différentes phases du cycle reproducteur. Elle représente une première étape vers une meilleure compréhension de son rôle physiologique et/ou pathologique dans le système immunitaire de la muqueuse endométriale et son implication dans la reproduction équine.

2.2 Matériel et Méthodes

Toutes les procédures impliquant des animaux ont été menées conformément aux directives relatives aux soins et à l'utilisation des animaux de laboratoire, émises par le Ministère français de l'Agriculture, et avec l'approbation du comité d'éthique (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Val de Loire) sous le numéro APAFIS#5084-201604142152987 v2.

2.2.1 Animaux et collecte d'échantillons

L'étude a été réalisée sur des animaux adultes destinés à la recherche, hébergés dans l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière (UEPAO ; INRAE Val de Loire 1297, Nouzilly, France), entre mars 2016 et janvier 2017. Trente-six ponettes Welsh, âgées de 5 à 18 ans, ont été incluses dans l'étude, et un total de 57 séries d'échantillons ont été récoltés.

Lors de l'échantillonnage, sept juments étaient nullipares, tandis que les 29 autres avaient déjà pouliné au moins une fois. Les juments ont été prélevées une fois ($n= 18$), deux fois ($n= 15$) ou trois fois ($n= 3$) au cours de la saison de reproduction.

Les juments ont été examinées par palpation et échographie transrectale afin de déterminer l'état du tractus génital ainsi que le stade du cycle reproducteur. Les données et les prélèvements ont été obtenus pendant la saison de reproduction auprès de 29 juments en œstrus (présentant un follicule dominant et de l'œdème endométrial) et de 18 juments en diœstrus (présentant un corps jaune en l'absence d'œdème). Dix juments en anœstrus saisonnier (ne présentant aucun follicule supérieur à 15 mm ni corps jaune) ont également été incluses dans l'étude. Des échantillons sanguins ont été prélevés par ponction veineuse jugulaire chez ces juments, et une concentration plasmatique de progestérone inférieure à 1 ng/ml (Panzani *et al.*, 2017) sur deux analyses à sept jours d'intervalle a confirmé l'anœstrus saisonnier.

Après nettoyage de la vulve et du périnée, un lavage utérin à faible volume (60 ml) a été effectué à l'aide d'un cathéter de récolte d'embryons bovin (Minitüb, Tiefenbach, Allemagne). Après un massage utérin par voie transrectale, le liquide a été recueilli par écoulement gravitationnel dans un tube conique gradué de 50 ml, puis les échantillons ont été immédiatement centrifugés à 600 g pendant 10 minutes. Les surnageants ont été collectés dans des tubes de 2 ml et conservés à -20 °C jusqu'à analyse.

Immédiatement après le lavage utérin, une biopsie endométriale de la région proximale d'une des cornes utérines a été obtenue à l'aide d'une pince à biopsie Alligator (Kruuse, Langeskov, Danemark). Les prélèvements endométriaux ont été fixés dans du formol 10 % puis inclus dans de la paraffine.

2.2.2 Histologie

Les biopsies endométriales ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine en vue d'un examen histopathologique par microscopie optique. Les lames ont été examinées, avec l'analyse d'au moins cinq champs, pour identifier la présence de neutrophiles dans l'épithélium luminal et le *stratum compactum*. Une infiltration de trois neutrophiles ou plus dans les prélèvements en œstrus (LeBlanc *et al.*, 2007), ou d'un ou plusieurs neutrophiles en diœstrus (Overbeck *et al.*, 2011, Kozdrowski *et al.*, 2015) et en anœstrus (Kozdrowski *et al.*, 2015), par champ au fort grossissement (400x), a été considérée comme un diagnostic d'endométrite. Les biopsies ont

été systématiquement classées selon le système de classification de Kenney et Doig (Kenney et Doig, 1986), modifié par Schoon *et al.* (Schoon *et al.*, 1992).

2.2.3 Dosage de la myéloperoxydase totale

Les concentrations de MPO totale dans le surnageant des lavages utérins à faible volume ont été déterminées à l'aide d'un kit ELISA commercial spécifique pour la MPO équine (Bioptis SA, Liège, Belgique) comme décrit précédemment (Franck *et al.*, 2005, Parrilla Hernández *et al.*, 2014). Après un criblage préliminaire, chaque échantillon a été dilué 50x et/ou 500x avant l'analyse. Chaque échantillon a été mesuré en double, et la valeur moyenne a été calculée. La concentration de MPO était inférieure à la limite de détection (<1,3 ng/ml) pour 3,8 % des échantillons. Parmi les 96,2 % des échantillons restants avec une concentration de MPO détectée, 68 % présentaient un CV intra-essai compris entre 0,6 % et 18,7 %. Les échantillons ayant un CV plus élevé correspondaient principalement à ceux dosés aux deux dilutions. Pour ces échantillons, la concentration correspondant à la dilution 50x a été considérée.

2.2.4 Dosage de la myéloperoxydase active

La concentration de MPO active dans le surnageant des lavages utérins à faible volume a été déterminée par SIEFED (Franck *et al.*, 2006). Chaque échantillon a été mesuré en double et la valeur moyenne a été calculée. La concentration de MPO active était inférieure à la limite de détection (<0,051 ng/ml) dans 23 % des échantillons. Parmi les échantillons restants (77 %), 70 % présentaient un CV intra-essai compris entre 0,6 et 15,4 %. Les échantillons avec un CV supérieur à 16 % correspondaient principalement à ceux proches de la limite inférieure de détection de la courbe d'étalonnage.

2.2.5 Dosage de protéines totales

La concentration de protéines totales dans le surnageant des lavages utérins à faible volume a été mesurée par la méthode de l'acide bicinchoninique pour la quantification des protéines (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA).

2.2.6 Immunohistochimie

Des coupes du tissu endométrial de 4 micromètres d'épaisseur ont été réalisées à partir des blocs de paraffine de juments en œstrus ($n= 11$), diœstrus ($n= 6$) et anœstrus ($n= 4$). Les coupes ont ensuite été déparaffinées et réhydratées selon un protocole standard.

Le démasquage des sites antigéniques par la chaleur a été effectué dans une solution tampon de démasquage pH 6 (Dako S1699, Santa Clara, CA, USA) à l'autoclave pendant 11 minutes à 126 °C, suivi d'un refroidissement de 20 minutes et d'un rinçage à l'eau distillée pendant 5 minutes à température ambiante. Les peroxydases endogènes ont ensuite été bloquées avec une solution H₂O₂/H₂O à 3 % pendant 20 minutes à température ambiante, puis les lames ont été rincées deux fois à l'eau distillée. Pour inhiber le marquage non spécifique, les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à température ambiante dans du *Protein Block Serum Free* (Dako X0909, Santa Clara, CA, USA). Les lames ont été incubées à température ambiante pendant 60 minutes avec un anticorps primaire de lapin anti-MPO (1/1500), obtenu contre la MPO équine purifiée (Franck *et al.*, 2005), puis pendant 30 minutes avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la HRP (*Envision System-Labeled Polymer-HRP*, DAKO, K4003). Après 5 lavages de 5 minutes au PBS, la révélation a été effectuée en appliquant une solution de tétrahydrochlorure de diaminobenzidine (DAKO K3468, Santa Clara, CA, USA) pendant 3 minutes. Enfin, les lames ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline, montées et protégées par une lamelle pour l'observation au microscope. Des coupes d'un cas confirmé de méningite équine ont été utilisées comme contrôle positif. Pour les contrôles négatifs, l'anticorps primaire a été omis.

2.2.7 Évaluation semi-quantitative du profil immunohistochimique de la myéloperoxydase

Le pourcentage des cellules immunomarquées ainsi que leur intensité de coloration ont été utilisés pour calculer le score d'immunoréactivité (IRS pour *immunoreactive score*), selon une méthode adaptée de Hoffmann *et al.* (2009b), afin d'évaluer plus précisément la présence de la MPO dans les tissus endométriaux. À cette fin, le pourcentage de cellules immunopositives (PP) a été déterminé dans cinq zones représentatives (400x) de chaque population cellulaire. Pour chaque cellule immunomarquée, l'intensité de coloration (SI pour *staining intensity*) a été évaluée et une valeur numérique lui a été attribuée (0 = aucune ; 0,5 = très faible ou avec un aspect ponctué; 1 = faible ; 2 = modérée ; 3 = forte). L'IRS a été calculé selon la formule :

5

$$\text{IRS} = 1/100 \sum \{ \text{PP}_n \times \text{SI}_n \}$$

n=1

Cette méthode a été appliquée à chaque échantillon de tissu endométrial dans son ensemble, ainsi que séparément pour les populations de cellules épithéliales suivantes : l'épithélium luminal, les canaux glandulaires, ainsi que les parties moyennes et profondes des glandes.

2.2.8 Analyses statistiques

Afin de limiter l'effet de dilution et de permettre les comparaisons entre les différentes phases du cycle reproducteur, les résultats sont exprimés en ratios de MPO totale ou active par rapport aux protéines totales, désignés respectivement par R_T et R_A . Un modèle linéaire mixte général (SAS version 9.3), y compris un test post hoc, a été utilisé pour comparer les données entre les groupes. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes des moindres carrés. Si le modèle ne convergeait pas, un modèle linéaire général a été utilisé pour comparer les groupes. D'autres analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9. La distribution normale des paramètres a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les concentrations de MPO et de protéines totales ne suivaient pas une distribution normale, tandis que les valeurs d'IRS étaient distribuées normalement. Les corrélations ont été évaluées à l'aide du test de Spearman. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

2.3 Résultats

2.3.1 Évaluation histologique

Un faible nombre de biopsies endométriales ont montré une infiltration tissulaire de neutrophiles (œstrus $n=3$; diœstrus $n=0$; anœstrus $n=2$). Étant donné que la biopsie utérine est considérée comme la méthode de référence pour le diagnostic de l'endométrite, les échantillons ont été jugés physiologiques et inclus dans l'étude lorsqu'aucun signe d'inflammation n'a été détectée par cette méthode. Un total de 52 échantillons a été inclus dans l'analyse : 8 échantillons obtenus en anœstrus, 18 en diœstrus et 26 en œstrus. Le degré de fibrose endométriale était inexistant ou léger chez toutes les juments à l'exception d'une seule, qui présentait un degré modéré de fibrose.

2.3.2 Myéloperoxidase

La MPO a été détectée dans tous les liquides récoltés par lavage utérin, à l'exception d'un échantillon obtenu en diœstrus et d'un autre en anœstrus dont la concentration de MPO totale était inférieure aux limites de détection du test. La concentration de MPO active était en dessous des limites de détection pour 12 échantillons, tous les groupes confondus. Les valeurs des concentrations de MPO active et totale sont présentées dans le Tableau 2.1. Des concentrations plus élevées de MPO totale ont été observées en œstrus par rapport aux autres phases du cycle. Les valeurs maximales de MPO active ont été mesurées en anœstrus.

Tableau 2.1. Moyennes des moindres carrés (+/- erreur standard) des concentrations de myéloperoxydase (MPO) totale et active, des protéines, du rapport MPO totale/protéines totales (R_T), et du rapport MPO active/protéines totales (R_A) dans les lavages utérins des juments, selon les phases du cycle étudiées: anœstrus, diœstrus et œstrus.

| | MPO Totale (ng/ml) | MPO Active (ng/ml) | Protéines (mg/ml) | R_T (ng/mg) | R_A (ng/mg) |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Anœstrus | 3798 (\pm 3464) ^a | 4,42 (\pm 0,84) ^a | 0,24 (\pm 0,26) ^a | 18512 (\pm 3994) ^a | 22,08 (\pm 3,46) ^a |
| Diœstrus | 2319 (\pm 2334) ^a | 0,52 (\pm 0,54) ^b | 0,41 (\pm 0,17) ^a | 4320 (\pm 2517) ^b | 1,75 (\pm 2,04) ^b |
| Œstrus | 8867 (\pm 1947) ^b | 0,85 (\pm 0,36) ^b | 0,77 (\pm 0,14) ^a | 13930 (\pm 2132) ^a | 1,48 (\pm 1,06) ^b |

Les valeurs avec un exposant différent dans la même colonne sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

2.3.3 Concentration en protéines totales

La concentration en protéines totale dans les lavages utérins (Tableau 2.1) variait individuellement, mais aucune différence statistique n'a été observée entre les groupes. La concentration en MPO totale était positivement corrélée avec la concentration en protéines totales en œstrus ($r = 0,6623$; $p < 0,001$) et en diœstrus ($r = 0,7155$; $p < 0,001$), mais pas en anœstrus. Cependant, aucune corrélation entre les concentrations en protéines totales et en MPO active n'a été observée dans aucun des groupes (Figure 2.1).

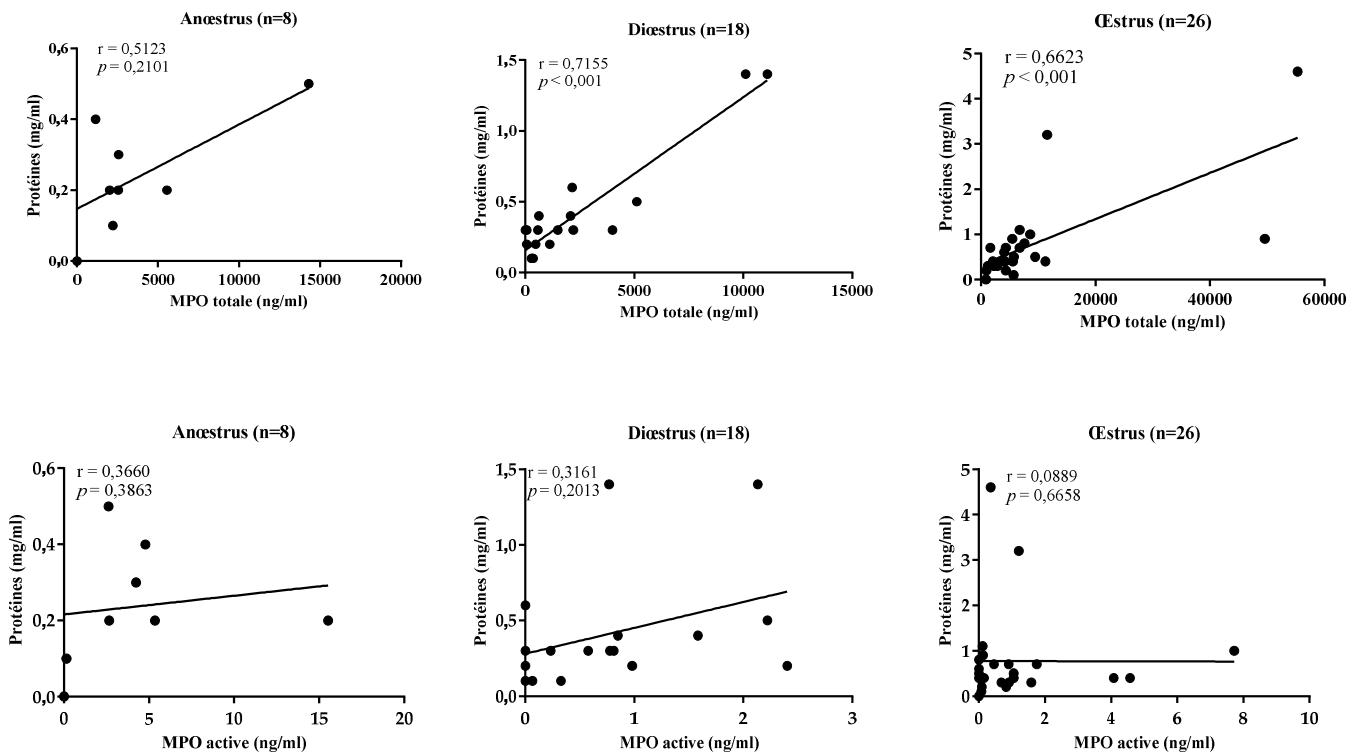


Figure 2.1. Association entre la concentration en protéines totales et les taux de myéloperoxydase (MPO) totale et active dans les lavages utérins chez les juments dans les phases du cycle étudiées : anœstrus, diœstrus et œstrus. Les valeurs $p < 0,05$ sont considérées comme significatives.

2.3.4 Rapport myéloperoxydase totale/protéines totales (R_T)

R_T pour les différents groupes est présenté dans le Tableau 2.1. Les valeurs de R_T variaient entre les échantillons et les groupes, avec des concentrations comprises entre 243,57 à 54807 ng/mg de protéines. Une différence significative a été observée entre les groupes étudiés ($p < 0,005$).

En diœstrus, R_T était significativement plus faible qu'en œstrus ($p < 0,005$) et qu'en anœstrus ($p < 0,005$). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes anœstrus et œstrus (Figure 2.2a).

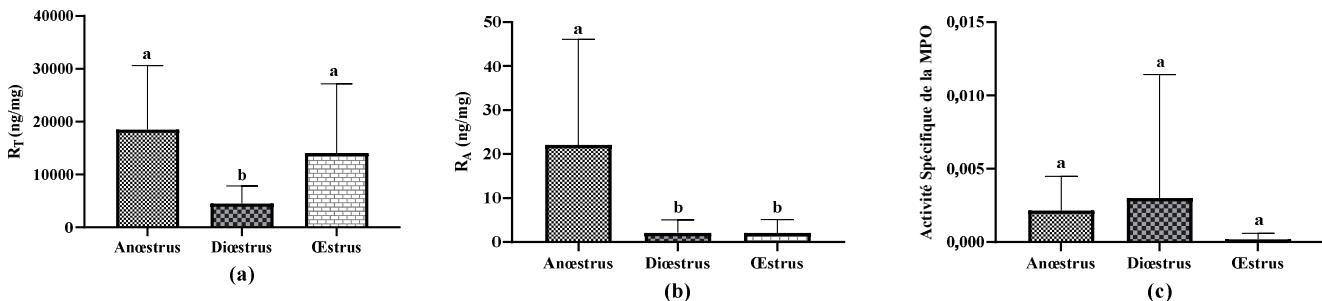


Figure 2.2. Myéloperoxydase (MPO) dans les liquides utérins de juments en anœstrus, diœstrus et œstrus en l'absence d'inflammation : (a) rapport MPO totale/protéines totales (R_T), (b) rapport MPO active/protéines totales (R_A), (c) activité spécifique de la MPO (MPO active/MPO totale). Les données sont présentées sous forme de données brutes (moyenne \pm SD). Les valeurs avec un exposant différent sont statistiquement distinctes ($p < 0,05$).

2.3.5 Rapport myéloperoxydase active/protéines totales (R_A)

Les valeurs R_A pour les différents groupes sont présentées dans le Tableau 2.1. Lorsque la MPO active a été détectée, R_A était généralement faible, avec des valeurs comprises entre 0,08 à 72,21 ng/mg de protéines. Une différence significative de R_A entre les groupes étudiés ($p < 0,0001$) a été observée. R_A était significativement plus élevée en anœstrus qu'en œstrus ($p < 0,0001$) et diœstrus ($p < 0,0001$). Néanmoins, aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes œstrus et diœstrus (Figure 2.2b). Aucune corrélation n'a été observée entre R_T et R_A dans aucun des groupes.

2.3.6 Activité spécifique de la myéloperoxydase

L'activité spécifique de la MPO a été exprimée comme le rapport des valeurs de la MPO active par rapport à la MPO totale. Les valeurs étaient très faibles dans tous les échantillons étudiés, avec une grande variabilité intragroupe, mais aucune différence statistique significative n'a été observée entre les groupes (Figure 2.2c).

2.3.7 Immunohistochimie

Détection de la MPO dans l'endomètre

Les neutrophiles ont été marqués dans tous les échantillons étudiés servant ainsi de contrôle positif de l'immunomarquage de la MPO. Un immunomarquage positif de la MPO a également été observé dans les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre, ainsi que dans les produits de sécrétion présents dans la lumière des glandes. La présence endométriale de la MPO variait entre les juments et était influencée par la phase du cycle reproducteur (Figure 2.3).

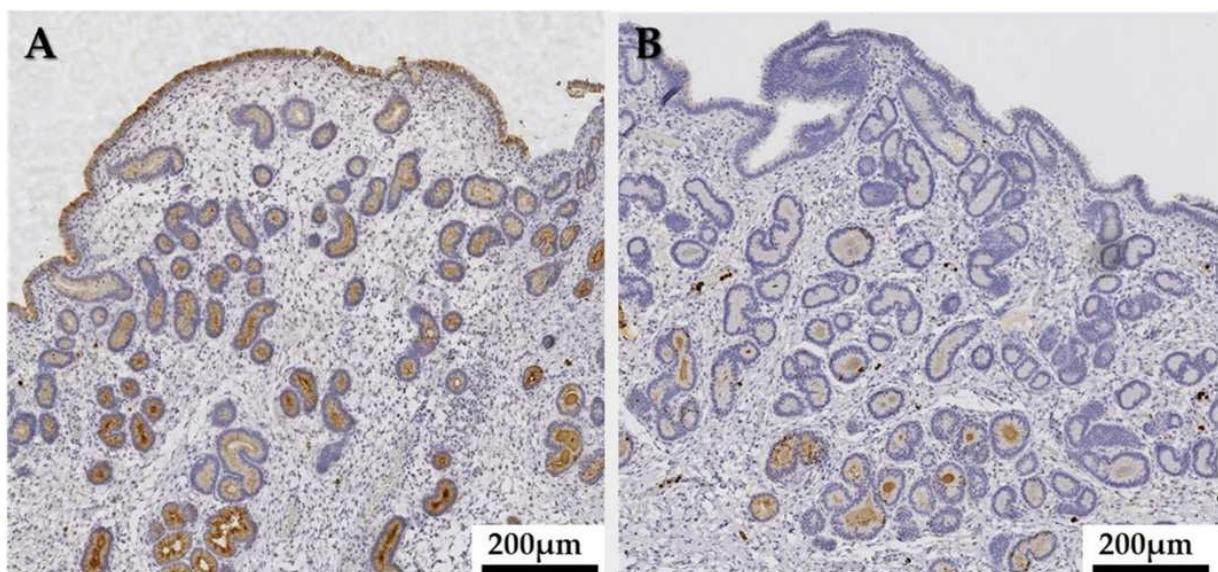


Figure 2.3. Immunohistochimie. Immunomarquage endométrial de la myéloperoxydase: comparaison chez une jument au cours du même cycle œstral, (A) en œstrus, où une distribution généralisée de cellules endométriales immunopositives est observée ; (B) en diœstrus, l'immunomarquage des cellules endométriales est principalement résiduel. Grossissement 100x.

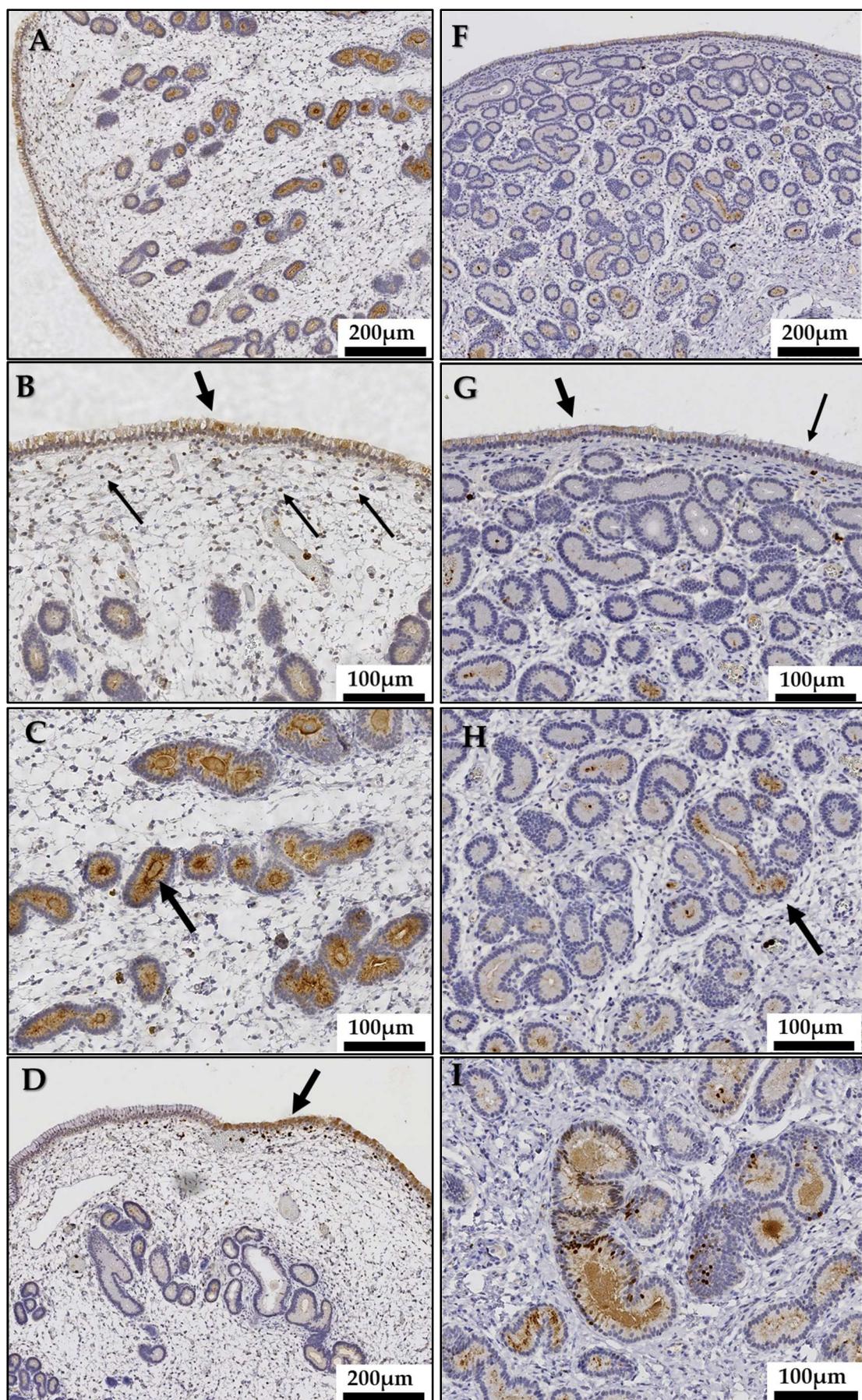
La détection maximale de la MPO a été observée en œstrus. Dans cette phase du cycle, un immunomarquage généralisé a été détecté dans les glandes utérines où l'intensité de la coloration augmentait avec la profondeur (Figure 2.4A). Les parties moyennes et profondes des glandes montraient un marquage uniforme, principalement localisé au pôle apical des cellules (Figure 2.4C), tandis que dans les parties droites des glandes, la coloration cytoplasmique était principalement diffuse. Parfois, une coloration nucléaire de cellules isolées a également été observée dans les glandes endométriales. En diœstrus, le marquage cytoplasmique de la MPO était moins étendu et seules certaines cellules épithéliales des

glandes, principalement dans les glandes profondes, étaient immunopositives (Figure 2.4F, H). Les cellules glandulaires présentant à la fois un marquage cytoplasmique et nucléaire, ou uniquement nucléaire, étaient plus fréquemment observées en diœstrus qu'en œstrus (Figure 2.4I).

L'épithélium luminal présentait un marquage irrégulier, bien qu'un immunomarquage plus généralisé ait été observé en œstrus par rapport au diœstrus. Dans les zones immunopositives, une coloration intracytoplasmique en mosaïque diffuse a été observée, avec des cellules présentant des intensités de coloration variables mélangées à des cellules immunonégatives (Figure 2.4B, G). Cependant, chez certaines juments présentant des neutrophiles dans les zones sous- et transépithéliales, un immunomarquage cellulaire uniforme était prédominant (Figure 2.4D).

Les cellules stromales, principalement situées dans le *stratum compactum*, présentaient un marquage diffus faible dans les deux phases du cycle (Figure 2.4B).

En anœstrus, seule une légère coloration périnucléaire résiduelle de la MPO a été observée dans les cellules épithéliales luminales, tandis que les autres populations cellulaires endométriales étaient immunonégatives (Figure 2.4E).



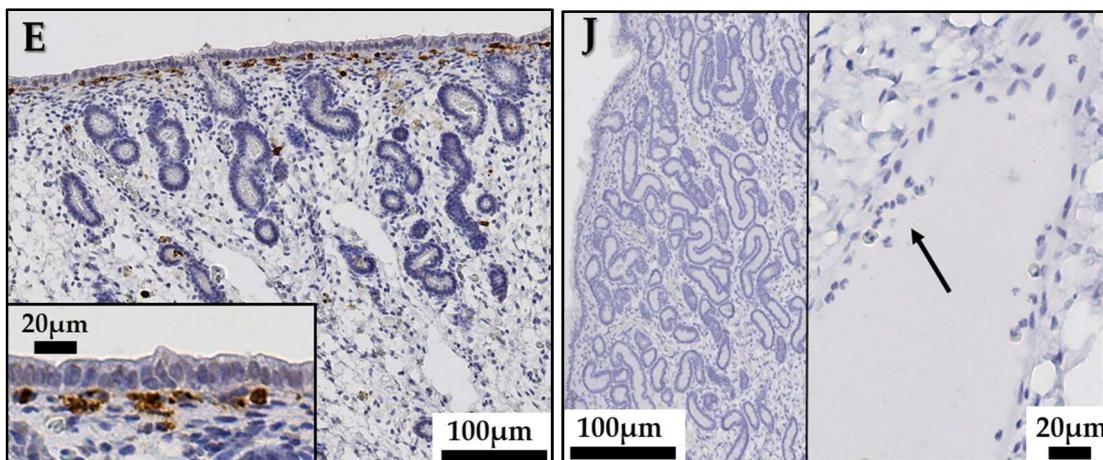


Figure 2.4. Immunohistochimie. Localisation de la myéloperoxydase (MPO) endométriale équine pendant le cycle œstral et l'anœstrus saisonnier. Les images représentent des échantillons de tissu endométrial de différentes juments en œstrus (**A–D**), anœstrus (**E**) et diœstrus (**F–I**). Œstrus : (**A**) Les cellules épithéliales endométriales montrent une présence généralisée de la MPO. L'intensité de la coloration dans les cellules épithéliales glandulaires augmente avec la profondeur. Grossissement 100x. (**B**) L'épithélium luminal montre une réaction de coloration généralisée en mosaïque diffuse intracytoplasmique (flèche épaisse). Un immunomarquage intracytoplasmique uniforme est observé dans les cellules stromales (flèches fines). Grossissement 200x. (**C**) Dans la partie moyenne et profonde des glandes utérines, les cellules présentent un immunomarquage diffus intracytoplasmique uniforme, principalement apical (flèche). Grossissement 200x. (**D**) En présence de neutrophiles dans les zones sous- et trans-épithéliales, l'épithélium luminal montre une coloration intracytoplasmique diffuse et uniforme (flèche). Grossissement 200x. Anœstrus : (**E**) Les cellules glandulaires endométriales sont immunonégatives. Grossissement 100x. En médaillon : l'épithélium luminal ne montre pas ou seulement une coloration résiduelle. Les neutrophiles dans les capillaires sous-épithéliaux sont positivement colorés. Grossissement 400x. Diœstrus : (**F**) L'immunomarquage des cellules épithéliales n'est pas généralisé. Grossissement 100x. (**G**) L'épithélium luminal est irrégulièrement marqué. Une coloration de type mosaïque diffuse intracytoplasmique est observée dans des zones immunopositives (flèche épaisse) près de zones immunonégatives (flèche fine). Grossissement 200x. (**H**) Les glandes endométriales montrent un immunomarquage MPO sporadique (flèche). Grossissement 200x. (**I**) : Certaines cellules localisées dans la partie profonde des glandes endométriales ont un immunomarquage sporadique de leur noyau avec parfois une coloration diffuse du cytoplasme. Grossissement 200x. (**J**) Contrôle négatif montrant l'absence de MPO dans les cellules épithéliales de l'endomètre (image de gauche, grossissement 100x) ; et dans les neutrophiles (image de droite, flèche, grossissement 400x).

Immunomarquage semi-quantitative de la MPO

L'immunomarquage général de la MPO, évaluée par l'IRS, était significativement plus élevé en œstrus que dans les autres phases du cycle reproducteur. De plus, à l'exception de l'épithélium luminal en diœstrus, pour chaque sous-population cellulaire, l'IRS était également significativement plus élevé en œstrus, avec des différences maximales observées dans les parties moyenne et profonde des glandes. Aucune différence significative n'a été constatée entre le diœstrus et l'anœstrus (Figure 2.5).

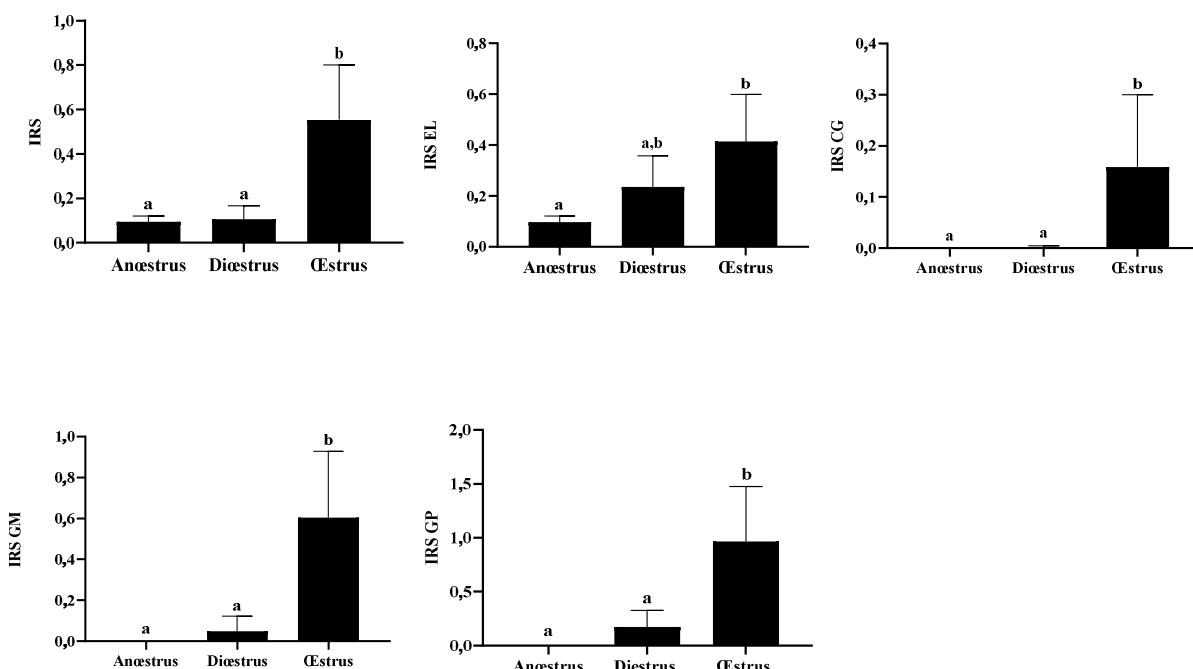


Figure 2.5. Score d'immunoréactivité (IRS) de la myéloperoxydase en fonction des phases du cycle étudiées, pour l'ensemble de l'endomètre et pour chaque population cellulaire. Les valeurs sont présentées sous forme de données brutes (moyenne \pm SD). Les valeurs avec un exposant différent sont statistiquement différentes ($p < 0,05$). **EL** : épithélium luminal ; **CG** : canaux glandulaires ; **GM** : partie moyenne des glandes ; **GP** : partie profonde des glandes.

En œstrus, la détection maximale de la MPO a été observée dans la partie profonde des glandes. Cela n'a pas été observé dans le diœstrus où les valeurs IRS entre les parties profondes des glandes et l'épithélium luminal n'étaient pas statistiquement différentes (Figure 2.6). La présence de la MPO dans les tissus endométriaux n'était corrélée ni avec R_T ni avec R_A dans le liquide utérin pour les différentes populations et groupes cellulaires étudiés.

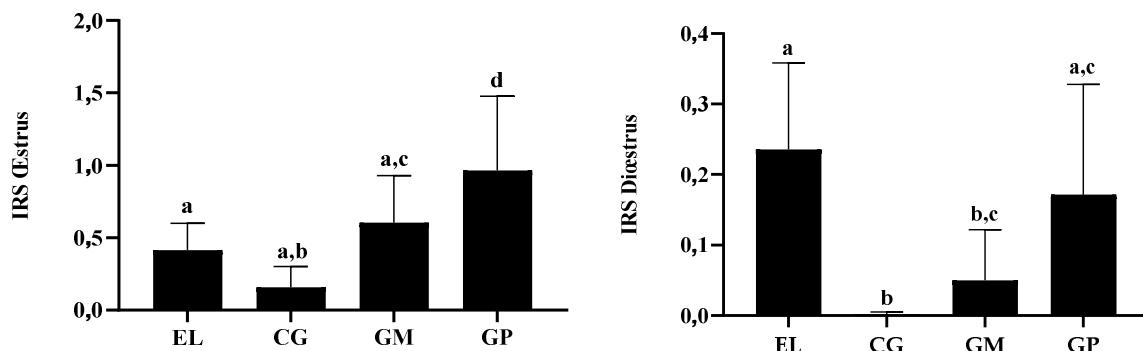


Figure 2.6. Score d'immunoréactivité (IRS) de la myéloperoxydase en œstrus et en diœstrus pour chaque population cellulaire. Les données sont présentées sous forme de données brutes (moyenne \pm SD). Les valeurs avec un exposant différent sont significativement différentes ($p < 0,05$). **EL** : épithélium luminal ; **CG** : canaux glandulaires ; **GM** : partie moyenne des glandes ; **GP** : partie profonde des glandes.

2.4 Discussion

La MPO est principalement contenue et libérée par les neutrophiles. Elle est considérée comme étant un marqueur de l'inflammation dans différents organes et tissus (Khan *et al.*, 2018). Cependant, la présence de MPO, indépendamment de la présence de neutrophiles, a été démontrée à des concentrations variables, dans les liquides récoltés lors de lavages utérins chez la jument en œstrus (Parrilla Hernández *et al.*, 2014). Ces observations sont en accord avec les résultats de la présente étude où dans des conditions physiologiques, la MPO totale (R_T) a été détectée, à des concentrations très variables dans les liquides des lavages utérins des juments en œstrus, ainsi que dans les autres phases étudiées. Ces données renforcent l'hypothèse d'une présence constante et physiologique de la MPO dans la lumière de l'utérus équin, non exclusivement liée à l'inflammation.

La principale source de MPO dans le sang sont les neutrophiles (Khalilova *et al.*, 2018). Cependant, dans nos échantillons, le nombre de neutrophiles se situait dans les limites physiologiques pour chaque phase du cycle reproducteur chez la jument (Kenney et Doig, 1986, LeBlanc *et al.*, 2007, Overbeck *et al.*, 2011, Kozdrowski *et al.*, 2015). Dans l'utérus équin sain et non enflammé, seulement quelques neutrophiles peuvent être observés dans l'endomètre en œstrus, tandis qu'en diœstrus, ils sont pratiquement inexistant (Kenney et Doig, 1986). Il a longtemps été admis que l'expression génique de la MPO, et par conséquent

sa biosynthèse, était exclusivement associée à des précurseurs myéloïdes (Austin *et al.*, 1996). Cependant, l'enzyme a été récemment localisée dans certaines cellules non myéloïdes aussi bien dans des conditions inflammatoires que physiologiques, et ce, dans divers organes (Green *et al.*, 2004, Roumeguère *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2015, Martínez-Marcos *et al.*, 2019). Notre étude montre, pour la première fois, la détection immunohistochimique de la MPO dans les cellules endométriales équines.

La MPO était localisée dans les cellules épithéliales et, dans une moindre mesure, dans les cellules stromales, avec des profils d'immunomarquage distincts en fonction des populations cellulaires, suggérant des différences fonctionnelles entre les types des cellules endométriales, comme cela a été observé pour d'autres protéines (Hoffmann *et al.*, 2009a, Schöniger *et al.*, 2013, Schöniger *et al.*, 2017, Schöniger *et al.*, 2018). Les parties moyennes et profondes des glandes ont montré un immunomarquage maximal de MPO avec un renforcement apical de la coloration qui, associé au fait que les sécrétions glandulaires intraluminales étaient également immunopositives, suggère une synthèse intracellulaire suivie d'une sécrétion intraluminale de MPO par les glandes utérines (Churg et Anderson, 1974, Hoffmann *et al.*, 2009a, Roumeguère *et al.*, 2012). L'immunomarquage maximal de la MPO en œstrus a été détecté dans l'ensemble de l'endomètre, tandis que dans le diœstrus, une diminution importante de la coloration et une distribution sporadique de l'immunoréactivité ont été observées, comme illustré sur la Figure 2.3. Cela est en accord avec les concentrations plus élevées de MPO (R_T) détectées dans les liquides récoltés lors de lavages utérins en œstrus par rapport au diœstrus. Bien que ces résultats doivent être confirmés par des approches transcriptomiques et protéomiques, telle que l'hybridation *in situ*, ils suggèrent que l'endomètre pourrait être une source de MPO en l'absence d'endométrite.

Contrairement aux parties moyennes et profondes des glandes, l'immunoréaction diffuse de la MPO observée dans l'épithélium luminal suggère une internalisation de l'enzyme plutôt qu'une synthèse intracellulaire. Les deux profils d'immunomarquage distincts observés dans l'épithélium luminal suggèrent des mécanismes d'absorption différentes de la MPO par les cellules épithéliales. Dans les zones où des neutrophiles sous- ou trans-épithéliaux ont été observés, les cellules épithéliales étaient systématiquement colorées, ce qui pourrait refléter une absorption de la MPO via un contact direct entre les neutrophiles et les cellules épithéliales, comme démontré *in vitro* dans les cellules endothéliales (Jerke *et al.*, 2013). En revanche, dans les régions de l'épithélium luminal dépourvues de neutrophiles, les cellules épithéliales ne présentaient aucune coloration ou un marquage en mosaïque. Ces variations d'intensité dans l'immunomarquage pourraient refléter soit des quantités variables de MPO

après absorption, soit une internalisation de la MPO intraluminale, comme cela a été démontré *in vitro* pour les cellules endothéliales et épithéliales pulmonaires (Yang *et al.*, 2001, Haegens *et al.*, 2008). De manière similaire, les cellules stromales étaient immunopositives dans certains échantillons, probablement en raison de l'absorption de MPO également, car les cellules stromales de l'endomètre semblent éliminer le matériel extravasé de l'interstitium endométrial (McRae, 1988).

Certaines cellules, principalement localisées dans les parties profondes des glandes des échantillons endométriaux prélevés en diœstrus, semblent présenter un immunomarquage nucléaire, parfois associée à une coloration cytoplasmique. Cette localisation nucléaire pourrait indiquer une translocation de la MPO vers le noyau et son implication potentielle dans la régulation de la transcription génique, comme proposé pour les β -défensines dans l'endomètre équin (Schöniger *et al.*, 2013). Étant donné que cette coloration nucléaire a été principalement observée dans les échantillons de diœstrus, on peut envisager que la translocation nucléaire de la MPO serve de mécanisme d'autorégulation ciblant sa transcription. À ce stade, nos résultats ne permettent pas de déterminer si la MPO adhère simplement à la membrane nucléaire, comme observé dans les cellules musculaires de cheval co-incubées avec de la MPO (Ceusters *et al.*, 2013), ou si elle atteint l'intérieur du noyau, comme démontré dans les lymphocytes B péritonéaux murins (de Araujo *et al.*, 2013). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer la localisation exacte de la MPO au niveau nucléaire et comprendre la signification fonctionnelle de cette coloration nucléaire.

Les cellules épithéliales de l'endomètre des juments, en plus de former une barrière muqueuse ininterrompue entre la lumière et les cellules et tissus sous-jacents, produisent une variété de substances essentielles au maintien de l'homéostasie endométriale et qui participent à la reproduction (Wira *et al.*, 2005b). Parmi celles-ci, les cellules épithéliales utérines produisent une gamme de microbicides naturels non spécifiques, tels que la lactoferrine (Kolm *et al.*, 2006) et le lysozyme (Katila *et al.*, 1990), qui confèrent aux sécrétions et au mucus utérin une protection contre les agents pathogènes potentiels. Ces substances jouent un rôle particulièrement important pendant la longue période de l'œstrus chez la jument, lorsque le col est ouvert et relâché et que la contamination ascendante de l'utérus est facilitée. Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour le confirmer, la concentration élevée de MPO, sa présence dans l'endomètre et le renforcement apicale de l'immunomarquage observé en œstrus, suggèrent que la MPO, étant une protéine bactéricide puissante, pourrait être synthétisée et sécrétée par l'endomètre équin afin de participer à la défense immunitaire de la muqueuse endométriale. Reste à déterminer si la sécrétion de MPO dans la lumière

utérine est constitutive et/ou induite par des stimuli spécifiques. Dans une étude de Yang et al. (2015), le marquage immunohistochimique de la MPO dans l'endomètre de rats diminuait après l'induction d'une inflammation par LPS. On peut supposer que cette diminution de la détection de l'enzyme est la conséquence d'une libération de la MPO intracytoplasmique dans la lumière utérine en réponse à cette inflammation. Associés à la présence de MPO dans l'endomètre équin observée dans notre étude, ces résultats suggèrent que la MPO pourrait être exprimée par l'endomètre pour prévenir une contamination ou une inflammation potentielle de l'utérus, et qu'elle pourrait être sécrétée dans la lumière utérine en réponse à des conditions spécifiques. Cela pourrait expliquer en partie la différence entre l'intensité de l'immunomarquage et la concentration de MPO (R_T) intraluminale dans nos échantillons physiologiques, comme illustré par l'absence de corrélation entre l'IRS et la concentration de MPO (R_T). Des études de données fonctionnelles sont nécessaires pour approfondir le rôle de la MPO dans l'utérus des juments ainsi que les conséquences de son dysfonctionnement.

La présence cyclique de la MPO et l'absence totale de coloration glandulaire dans les cellules endométriales en anœstrus sont cohérentes avec une expression protéique régulée par les hormones stéroïdiennes. Chez la femme, l'activité de la MPO dans les neutrophiles sanguins semble être régulée par le cycle menstruel (Békési *et al.*, 2001, Shibata *et al.*, 2017), et une régulation à la hausse de l'activité de la MPO par les œstrogènes a été suggérée, probablement par la stimulation directe de la transcription de la MPO (Békési *et al.*, 2001). Dans les tissus utérins de rats, il a été rapporté que l'activité de la MPO augmentait pendant la phase folliculaire du cycle, diminuait durant la phase lutéale et atteignait des niveaux minimaux en fin de dicestrus (Houdeau *et al.*, 2005). Cependant, les auteurs de cette étude ont mesuré l'activité peroxydase, qui n'est pas exclusive à la MPO mais commune à toutes les peroxydases. Néanmoins, leurs résultats concordent avec ceux d'autres études qui montrent que les peroxydases dans le tissu utérin sont régulées à la hausse par les œstrogènes (Okada *et al.*, 1985, Farley *et al.*, 1992, Cummings et Metcalf, 1994, Baiza-Gutman *et al.*, 2000) via leurs récepteurs (Batra et Losif, 1992), tandis que la progestérone inhibe l'induction par les œstrogènes des peroxydases utérines. Nos résultats montrent qu'un schéma de régulation similaire s'applique à la MPO dans l'endomètre équin, car l'immunomarquage était important en œstrus, diminué en dicestrus et totalement absent en anœstrus. Cette hypothèse est en outre étayée par la corrélation positive entre la concentration de MPO et celle des protéines totales observées en œstrus et en dicestrus lorsque les stéroïdes sont sécrétés, alors qu'aucune corrélation de ce type n'existe en anœstrus en l'absence de concentrations significatives d'hormones stéroïdiennes.

La population de neutrophiles dans l'endomètre en anœstrus n'a pas encore été étudiée spécifiquement. Lors de l'évaluation du nombre de neutrophiles comme marqueurs de l'inflammation, un même seuil est souvent utilisé en anœstrus et en diœstrus, car la perméabilité de la barrière hémato-utérine est considérée comme basale pendant ces deux phases, alors qu'elle est augmentée sous l'influence des œstrogènes (Grant-Tschudy et Wira, 2004). Toutefois, ce seuil ne prend pas en compte l'effet de la progestérone dans la suppression de la défense immunitaire utérine (Lewis, 2003), ce qui peut réduire la migration des neutrophiles dans la lumière utérine (Watson *et al.*, 1987a). En anœstrus, lorsque l'utérus n'est pas sous l'influence d'hormones stéroïdiennes, l'immunité de l'endomètre peut être similaire à celle d'autres systèmes de muqueuses. En effet, notre étude a montré que dans les échantillons d'anœstrus, les neutrophiles étaient principalement observés dans les capillaires sous-épithéliaux, avec un passage trans-épithéial sporadique et jument dépendante. Cette présence de neutrophiles dans la muqueuse endométriale est probablement physiologique et adaptée aux besoins de l'endomètre, pour contrôler le microbiote (Chadwick *et al.*, 2021) ainsi que pour faire face à une éventuelle contamination (Seals *et al.*, 2002, Lewis, 2003). L'activation de ces neutrophiles dans le cadre du système de défense des muqueuses, pourrait être à l'origine d'une partie de la MPO (R_T) observée dans les échantillons d'anœstrus.

L'accumulation intraluminale de MPO issue de cycles successifs et/ou d'endométrites antérieures pourrait expliquer les différences individuelles des concentrations de MPO (R_T) observées entre les juments. L'accumulation de liquide intraluminal chez les juments en œstrus a été associée à des concentrations plus élevées de MPO (Parrilla Hernández *et al.*, 2014). Un drainage insuffisant du liquide luminal par le col de l'utérus et/ou le système lymphatique pourrait réduire l'élimination de la MPO de l'utérus, favorisant son accumulation d'un cycle à l'autre. Ainsi, la capacité individuelle de la jument à éliminer la MPO de la lumière utérine pourrait expliquer les concentrations plus élevées de MPO (R_T) dans certains échantillons de diœstrus, alors que pour d'autres, les niveaux de l'enzyme étaient inférieurs à la limite de détection du test. De plus, l'accumulation de MPO provenant de phases cycliques physiologiques antérieures ou d'épisodes inflammatoires passés pourrait être à l'origine des concentrations de MPO (R_T) particulièrement élevées qui ont été observées chez certaines juments en anœstrus.

La MPO joue un rôle protecteur important dans la défense immunitaire innée (Klebanoff, 1967). Cependant, par les mêmes mécanismes impliqués dans la destruction des agents pathogènes, la MPO dans le milieu extracellulaire peut également être néfaste pour les cellules et tissus hôtes (comme récemment revu dans (Davies et Hawkins, 2020, Kargapolova *et al.*, 2021)). Ainsi, la présence constante de MPO dans la lumière utérine soulève la question de sa contribution potentielle au développement de certaines pathologies de l'endomètre. Il a été suggéré que la MPO pourrait participer au développement de la fibrose dans l'endomètre équin (Rebordão *et al.*, 2018, Rebordão *et al.*, 2021). La fibrose endométriale est en partie liée à l'inflammation endométriale, étant donné que l'endométrite persistante de post-saillie entraîne une augmentation du recrutement des neutrophiles et une augmentation de la fibrose chez les juments (Reilas *et al.*, 2016). En effet, les juments diagnostiquées avec une endométrite présentent des concentrations plus élevées de MPO que celles sans inflammation apparente (Parrilla Hernández *et al.*, 2014). Néanmoins, même les juments nullipares, dont l'utérus n'a jamais été exposé à la semence, développent une fibrose endométriale dont la sévérité est corrélée à l'âge (Ricketts et Alonso, 1991). Ces éléments suggèrent que l'expression et la sécrétion de MPO par les cellules endométriales épithéliales, tout au long de la vie reproductive, pourraient contribuer à la progression naturelle de la fibrose endométriale, tandis que l'exposition à l'inflammation, en particulier si elle est persistante, et la libération accrue de MPO qui en résulte, pourraient accélérer et/ou aggraver ce processus.

Auparavant, il a été démontré que certaines juments, bien qu'aucun signe d'endométrite ne soit observé, présentaient des concentrations élevées de MPO totale dans la lumière utérine similaires à celles des juments présentant une inflammation confirmée (Parrilla Hernández *et al.*, 2014). Dans la présente étude, la MPO détectée dans les liquides récoltés par lavage utérin était principalement enzymatiquement inactive. Concernant la présence de MPO active (R_A) dans les différentes phases du cycle reproducteur, nos résultats suggèrent la présence de facteurs de régulation dans le liquide utérin modulant l'activité de la MPO afin d'adapter la réponse immunitaire aux besoins spécifiques de l'endomètre et prévenir ainsi les effets néfastes sur les cellules et les tissus hôtes.

Une fraction significative de la MPO est inactivée au cours de la phagocytose, lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire (Bradley *et al.*, 1982, Edwards *et al.*, 1987), mais les mécanismes d'inhibition impliqués restent à élucider. De plus, certaines molécules sont capables d'inhiber la MPO plasmatique par différents mécanismes et à des degrés variables (Klebanoff, 1979, King *et al.*, 1997, Galijasevic *et al.*, 2008a, b), bien que, à notre connaissance, elles n'ont pas encore été étudiées dans le liquide utérin. Dans le surnageant

de sperme équin, où des concentrations élevées de MPO totale sont également observées, Ponthier et al. ont rapporté une présence importante du précurseur de la MPO (Ponthier et al., 2014). Contrairement à ce qui est observé chez l'humain (Klebanoff, 2005), le précurseur de l'enzyme est inactif chez le cheval (Franck et al., 2005), et est ensuite clivé dans la sous-unité active de l'enzyme. Ainsi, la faible activité de la MPO mesurée dans les liquides utérins pourrait être attribuée à une présence élevée du précurseur inactif de la MPO mais également, à la présence potentielle d'inhibiteurs de la MPO dans ces liquides. Des études supplémentaires sont nécessaires pour approfondir la dynamique de la MPO et son activité au sein de l'endomètre des juments dans les différentes situations reproductives.

Outre ses fonctions enzymatiques, la MPO a également été décrite comme étant capable de moduler la migration des neutrophiles (Klinke et al., 2011), augmenter le facteur TNF- α (Lefkowitz et al., 1999) et réguler les cytokines (Lefkowitz et al., 2000). Ces activités non catalytiques, combinées à nos observations sur les différents états reproductifs physiologiques de l'utérus, mettent en évidence le rôle essentiel de la MPO dans le maintien de l'homéostasie endométriale équine, même lorsqu'elle n'est pas active enzymatiquement.

2.5 Conclusion

Il s'agit de la première étude caractérisant la MPO dans l'endomètre sain de juments. La MPO est présente de manière constante dans l'utérus des juments au cours du cycle reproducteur, indépendamment de l'inflammation, ce qui suggère un rôle physiologique de l'enzyme dans la reproduction équine.

Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour confirmer notre hypothèse, nos observations sur la localisation endométriale cyclique de la MPO et ses fonctions biologiques, soutiennent l'idée que les cellules endométriales équines constituent, dans des conditions physiologiques, la principale source de la MPO utérine. Cette enzyme pourrait ainsi contribuer, en tant qu'acteur du système immunitaire de la muqueuse endométriale, à la prévention de la contamination et de l'inflammation de l'utérus chez la jument.

Section expérimentale

Étude 3

Évaluation immunohistochimique de la myéloperoxydase dans l'endomètre équin atteint d'endométreose

Journal of Equine Veterinary Science 2023, 125:104736

Parrilla Hernández S, Reigner F, Feyereisen E, Munaut C, Franck T, Deleuze S

3.1 Introduction

Au terme de notre deuxième étude, nous avons observé qu'en plus d'être un marqueur de l'activation des neutrophiles et de l'inflammation, la MPO est également localisée dans les cellules épithéliales de l'endomètre chez la jument en conditions physiologiques. À l'instar d'autres protéines (Hoffmann *et al.*, 2009a), la détection endométriale de la MPO est cyclique, avec une présence maximale en œstrus, diminuée en diœstrus et totalement absente en anœstrus. Sur base de son immunomarquage endométrial et de ses fonctions biologiques, nous avons émis l'hypothèse que la MPO, en tant que composant du système immunitaire de la muqueuse endométriale, participe aux mécanismes de protection utérine et pourrait jouer un rôle dans la prévention des infections et de l'inflammation dans l'endomètre équin. Cette observation nous a conduits à nous interroger sur l'impact potentiel qu'une altération de la présence de la MPO pourrait avoir sur les mécanismes de défense immunitaire de l'utérus.

L'endométriose, une affection utérine dégénérative et l'une des causes majeures d'infertilité chez la jument (Kenney, 1978, Kenney et Doig, 1986), est caractérisée par la présence de fibrose dans le stroma endométrial et autour des glandes utérines, pouvant affecter une seule branche ou plusieurs d'entre elles, formant ainsi des nids glandulaires (Kenney, 1978). Les cellules stromales autour des glandes fibrotiques peuvent être métaboliquement actives ou inactives, et dans ces deux cas, l'endométriose peut être considérée comme destructive (les cellules épithéliales des glandes entourées de fibrose sont dégénérées et nécrosées) ou non-destructive (les cellules épithéliales glandulaires sont intactes) (Hoffmann *et al.*, 2009c). La fibrose périglandulaire pourrait être associée à une dysfonction des cellules épithéliales glandulaires atteintes (Schöniger et Schoon, 2020). Par ailleurs, une altération du profil immunohistochimique endométriale de certaines protéines jouant un rôle important dans le développement embryonnaire a été rapportée chez des juments atteintes d'endométriose (Hoffmann *et al.*, 2009b).

L'objectif de cette étude était donc d'investiguer le profil immunohistochimique de la MPO dans l'endomètre équin atteint d'endométriose, afin de mieux comprendre le lien potentiel entre cette entité pathologique et l'infertilité chez la jument.

3.2 Matériel et Méthodes

Toutes les procédures impliquant des animaux ont été réalisées conformément aux directives pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire, émises par le Ministère français de l'Agriculture et avec l'approbation du Comité d'éthique (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Val de Loire) sous le numéro APAFIS#5084-201604142152987 v2.

L'étude a été conduite sur des animaux adultes destinés à la recherche et hébergés dans l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière (UEPAO ; INRAE Val de Loire 1297, Nouzilly, France) entre avril et octobre 2016. Après nettoyage de la vulve et du périnée, une biopsie endométriale de la région proximale d'une des cornes utérines a été obtenue à l'aide d'une pince à biopsie Alligator (Kruuse, Langeskov, Danemark) sur 12 ponettes Welsh en œstrus âgées de 5 à 18 ans. Les prélèvements endométriaux ont été fixés dans du formol 10 % et inclus dans de la paraffine. Puis les tissus ont été coupés, montés sur lames, et colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Après examen histologique, les biopsies avec moins de trois neutrophiles par champ (400x) et présentant une fibrose endométriale selon le système de classification de Kenney et Doig (Kenney et Doig, 1986), modifié par Schoon et al. (Schoon *et al.*, 1992) ont été retenues pour étude. Une analyse immunohistochimique utilisant un anticorps spécifique de la MPO équine a été réalisée comme décrit précédemment au point 2.2.6 de cette section (Parrilla Hernández *et al.*, 2023).

3.3 Résultats

Des 12 juments examinées, sept répondant aux critères d'inclusion suivants : un endomètre libre d'inflammation et une fibrose endométriale légère ou modérée, ont été étudiées. Dans les régions saines de l'endomètre, le marquage immunohistochimique de la MPO était maximal dans les parties moyennes et profondes des glandes utérines. Par rapport aux glandes non affectées, la plupart des cellules épithéliales des glandes entourées de fibrose, tant dans les branches individuelles que dans les nids glandulaires, présentaient une diminution ou un manque total d'immunomarquage (Figure 3.1).

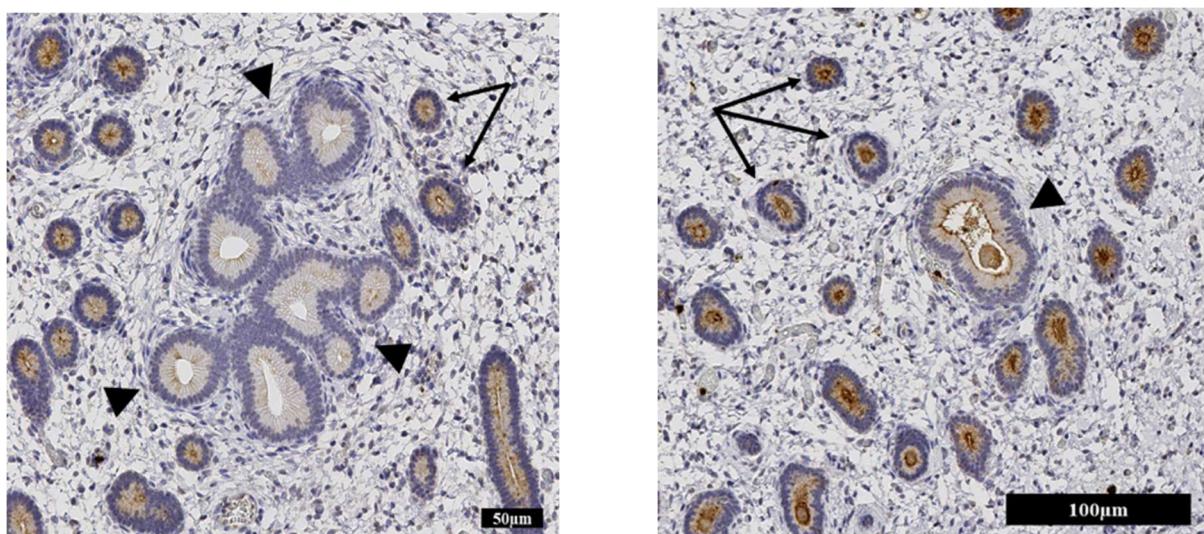


Figure 3.1. Immunohistochemistry. Immunomarquage de la myéloperoxydase dans l'endomètre équin. Les images illustrent des échantillons de tissu endométrial provenant de différentes juments en œstrus atteintes de fibrose endométriale. Les glandes affectées par la fibrose (têtes de flèche) montrent une diminution ou une absence de coloration par rapport aux cellules épithéliales des glandes non affectées (flèches). Grossissement 200x.

3.4 Discussion

Le marquage immunohistochimique de la MPO dans l'endomètre équin est cyclique, avec une présence maximale de l'enzyme en œstrus, localisée principalement dans les parties moyennes et profondes des glandes utérines (Parrilla Hernández *et al.*, 2023). Le profil d'immunomarquage observé dans cette étude suggère que la présence de la MPO dans l'épithélium glandulaire au sein des foyers fibrotiques ne répond pas aux signaux des hormones stéroïdiennes. Les glandes atteintes de fibrose montraient un immunomarquage totalement en opposition à celui des glandes saines, conforme aux résultats d'études antérieures portant sur d'autres protéines exprimées par l'endomètre (Hoffmann *et al.*, 2009b, Schöniger *et al.*, 2016, Schöniger *et al.*, 2018). Cette diminution de la détection de la MPO en présence de fibrose périglandulaire pourrait être liée à une interruption de la communication paracrine entre les cellules stromales et épithéliales, nécessaires à la régulation par les hormones sexuelles des protéines sécrétaires utérines (Pierro *et al.*, 2001). Cette interruption pourrait résulter d'une expression asynchrone des récepteurs stéroïdiens dans les cellules épithéliales des glandes affectées et dans les propres cellules stromales fibrotiques, et qui semble dépendre du type d'endométrie (Hoffmann *et al.*, 2009c). L'intégrité de la lame basale est également très importante et nécessaire pour maintenir la communication entre les

cellules stromales et glandulaires (Arnold *et al.*, 2001). Une lame basale endommagée, parfois présente dans les foyers fibrotiques (Hoffmann *et al.*, 2009c), pourrait être aussi responsable de la diminution de l'immunomarquage de la MPO observée dans cette étude.

L'endométriose est associée à une diminution de la capacité de l'endomètre à mener une gestation à terme (Kenney, 1978, Kenney et Doig, 1986). Une altération du profil immunohistochimique endométriale des protéines nécessaires au développement embryonnaire, ainsi qu'une diminution de l'abondance de certaines de ces protéines dans les sécrétions utérines, ont été associées à l'endométriose chez la jument (Hoffmann *et al.*, 2009b, Diel de Amorim *et al.*, 2020). Il a été proposé que ces modifications pourraient contribuer à la diminution de la fertilité observée chez les juments atteintes de cette condition pathologique (Hoffmann *et al.*, 2009b, Diel de Amorim *et al.*, 2020).

Au regard du rôle de la MPO dans le système immunitaire inné, la diminution observée de sa détection dans cette étude pourrait refléter un profil immunitaire déficient de l'utérus, entraînant une réduction de la protection utérine contre les agressions externes. Par ailleurs, une altération de l'immunomarquage d'autres protéines immunitaires (Schöniger *et al.*, 2016, Schöniger *et al.*, 2018), a également été rapportée en lien avec la présence de fibrose endométriale, ce qui renforce notre hypothèse.

3.5 Conclusion

Des recherches plus approfondies sur un plus grande nombre d'échantillons et incluant les différents degrés et types d'endométriose sont nécessaires. Néanmoins, la détection réduite de la MPO observée dans cette étude, par rapport à celle attendue lors de l'œstrus, suggère que l'endométriose pourrait entraîner une perturbation de l'environnement immunitaire utérin, augmentant potentiellement la susceptibilité aux infections utérines et à l'endométrite chez les juments.

Discussion Générale

Initialement, nos travaux de recherche étaient centrés sur l'étude de la concentration de la MPO en tant que marqueur inflammatoire dans les liquides de lavages utérins, avec l'objectif ambitieux de trouver une méthode, non-invasive et facilement réalisable sur le terrain, pour le diagnostic de l'endométrite chez la jument et/ou l'évaluation de la susceptibilité individuelle à la développer. Bien que nos études ne nous aient pas permis de remplir notre objectif initial, les résultats obtenus ont soulevé des questions intéressantes pouvant contribuer largement au développement des connaissances sur le système de défense utérin chez la jument.

1. MPO COMME POSSIBLE BIOMARQUEUR D'ENDOMÉTRITE

Une **première** investigation nous a permis de confirmer que la MPO est présente et peut être quantifiée par dosage immunologique dans les liquides de lavages utérins chez la jument. Nous avons également mis en évidence une corrélation positive entre la concentration de MPO totale et la présence de neutrophiles dans la lumière utérine, ces derniers étant utilisés comme critère diagnostique d'endométrite par cytologie. Comme attendu, la concentration de MPO était significativement plus élevée chez les juments atteintes d'endométrite que chez les juments saines. Ces résultats indiquent que, conformément à notre hypothèse initiale, la MPO constitue un biomarqueur potentiel pour le diagnostic d'endométrite chez la jument. Cette observation est par ailleurs étayée par une étude récente de Da Silva *et al.* (2024) qui ont également constaté une augmentation significative de la détection de la MPO dans le protéome de juments atteintes d'endométrite bactérienne par rapport à celui de juments saines.

Cependant, de manière intéressante et inattendue, la MPO n'était pas uniquement présente chez les juments atteintes d'endométrite. Dans tous les prélèvements analysés, des concentrations très variables de MPO ont été quantifiées, y compris chez les juments saines. Dans cette première étude, toutes les juments étaient en œstrus au moment du prélèvement. Dans cette phase du cycle, la présence de quelques neutrophiles est tolérée sous le seuil diagnostique permettant de classer une jument comme étant indemne d'endométrite. Cependant, bien que nous ne puissions exclure qu'une partie de la MPO détectée dans des conditions physiologiques soit libérée par ces quelques neutrophiles, cela n'explique pas les concentrations observées, qui, dans certains cas, approchaient celles mesurées chez les juments atteintes d'endométrite. Ces résultats suggèrent que la MPO détectée dans la lumière utérine des juments saines en œstrus pourrait avoir une origine, au moins en partie, distincte de celle des neutrophiles ou d'un processus inflammatoire associé à leur activation, jouant possiblement un rôle physiologique dans l'utérus de la jument.

2. MPO DANS L'UTÉRUS DE LA JUMENT EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

Au vu des résultats intrigants obtenus lors de cette première étude, il nous a semblé pertinent de revenir en amont et de nous intéresser au système immunitaire de l'utérus en conditions physiologiques. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la MPO dans l'utérus de la jument en l'absence d'inflammation, tout au long du cycle reproducteur, afin d'obtenir des premières informations sur l'origine de la MPO dans l'utérus et son rôle potentiel dans la reproduction équine. De plus, cette étape préalable était nécessaire avant d'envisager l'utilisation de la MPO dans le diagnostic d'endométrite.

2.1 MPO utérine

La **deuxième** étude menée dans le cadre de cette thèse nous a permis de confirmer qu'en conditions physiologiques, une MPO intrinsèque à l'utérus ou MPO utérine - pour faciliter la lecture de ce manuscrit - semble être présente de manière constante dans l'utérus de la jument en œstrus. Afin de réduire le risque de faux négatifs, dus au manque de sensibilité de la méthode de diagnostic par cytologie (Overbeck *et al.*, 2011, Cocchia *et al.*, 2012, Diel de Amorim *et al.*, 2016) ou à la présence d'endométrites subcliniques (Overbeck *et al.*, 2011), nous avons utilisé l'examen histologique des biopsies utérines comme méthode de référence dans le diagnostic de l'endométrite chez la jument (Nielsen, 2005, Nielsen *et al.*, 2012). Les résultats obtenus étaient similaires à ceux de la première étude. Malgré un nombre physiologique de neutrophiles conforme à la phase du cycle étudiée, la MPO était toujours présente, à des concentrations très variables, certaines dépassant les valeurs de MPO rapportées dans d'autres liquides biologiques chez le cheval, tant en conditions physiologiques que pathologiques (Art *et al.*, 2006a, Art *et al.*, 2006b, Grulke *et al.*, 2008). Nous avons également observé que la MPO utérine est détectable, à des concentrations aussi variables, dans les autres phases du cycle reproducteur. Cependant, sa présence n'est pas constante en dehors de l'œstrus.

Nous sommes conscients que nos études présentent certaines limites, notamment concernant l'utilisation des concentrations de MPO dans le liquide utérin comme outil diagnostique d'endométrite. Le lavage utérin, en tant que méthode de prélèvement, a déjà été utilisé pour évaluer les concentrations d'autres molécules immunitaires présentes dans le liquide utérin (Reilas et Katila, 2002, Lection *et al.*, 2024). Cependant, cette méthode entraîne une dilution des sécrétions utérines, dont la quantité varie selon les juments et les phases du cycle. Présenter les concentrations en MPO sous forme de ratio par rapport aux protéines totales atténue cet effet de dilution et facilite la comparaison entre les différentes phases du cycle.

Bien qu'initialement développé pour mesurer la MPO totale dans le plasma et le sérum équins (Franck *et al.*, 2005), le kit ELISA spécifique à la MPO équine a également été utilisé pour analyser d'autres liquides biologiques chez le cheval (Art *et al.*, 2006a, Art *et al.*, 2006b, Grulke *et al.*, 2008). Dans nos études, il a permis de détecter la MPO dans les liquides de lavage utérin chez la jument. Néanmoins, des courbes de références spécifiques à ce type d'échantillon n'ont pas encore été établies. Ainsi, bien que les valeurs absolues ne soient actuellement pas exploitables pour une interprétation clinique directe, elles nous ont permis d'étudier la dynamique relative de la MPO au cours des différentes phases du cycle.

2.2 Origine de la MPO Utérine

Notre deuxième étude nous a également permis, pour la première fois, de détecter par immunohistochimie la présence de la MPO dans les cellules endométriales équines, à partir de biopsies utérines prélevées chez des juments saines.

Il a longtemps été accepté que l'expression génique de la MPO, et par conséquent sa biosynthèse, était exclusivement associée aux précurseurs myéloïdes (Austin *et al.*, 1996). Cette affirmation est encore largement utilisée dans la littérature scientifique la plus récente sans remise en question (Kargapolova *et al.*, 2021). Néanmoins, de manière fortuite, la MPO a été détectée chez l'humain dans des cellules neuronales (Green *et al.*, 2004), observation confirmée dans la même étude par la présence tant de la protéine que de son ARNm dans des cellules neuronales de rat en culture (Green *et al.*, 2004). Roumeguère *et al.* (2012) ont rapporté que la MPO était également localisée dans les cellules sécrétaires de la prostate, mais son origine n'a pas pu être déterminée (Roumeguère *et al.*, 2023). Cependant, l'expression du gène codant pour la MPO, ainsi que la présence de la protéine, ont été mises en évidence dans les tissus du tractus reproducteur du bétail, avec une présence plus importante au niveau des testicules et des glandes bulbo-urétrales (Martínez-Marcos *et al.*, 2019). L'enzyme a également été localisée dans les spermatozoïdes chez cette même espèce (Martínez-Marcos *et al.*, 2019). Chez l'étalon, dans le surnageant du sperme, la source de la MPO détectée en l'absence de cellules inflammatoires reste indéterminée (Ponthier, 2012). Seules des cellules non spermatiques, identifiées principalement comme des cellules épithéliales ou des débris cellulaires, présentaient un marquage positif à la MPO (Ponthier *et al.*, 2012). Ces observations issues des types cellulaires distincts et d'espèces différentes, convergent, à l'instar de nos résultats, vers l'hypothèse d'une origine de la MPO indépendante des neutrophiles, et soulèvent des questions quant à l'affirmation, largement répandue, selon laquelle la MPO est exclusivement associée à des conditions inflammatoires.

Dans nos travaux, la présence de la MPO dans l'endomètre équin était cyclique et probablement dépendante des hormones stéroïdiennes. Des études réalisées chez d'autres espèces ont montré que les peroxydases dans le tissu utérin sont régulées positivement par les œstrogènes (Okada *et al.*, 1985, Farley *et al.*, 1992, Cummings et Metcalf, 1994, Baiza-Gutman *et al.*, 2000), via leurs récepteurs (Batra et Losif, 1992), tandis que la progestérone inhiberait leur induction (Okada *et al.*, 1985, Batra et Losif, 1992, Cummings et Metcalf, 1994). L'immunomarquage observé dans les différentes phases du cycle dans notre étude suggère qu'un schéma de régulation similaire s'applique également à la MPO dans l'endomètre équin, où elle est exprimée pendant l'œstrus, tandis qu'en dioœstrus, sa faible détection reflète probablement une persistance résiduelle de l'œstrus précédent (Figure 2.3).

Néanmoins, à l'instar d'autres protéines étudiées dans l'endomètre équin (Tunón *et al.*, 1995, Hoffmann *et al.*, 2009a, Schöniger *et al.*, 2016, Schöniger *et al.*, 2018), le marquage immunohistochimique de la MPO était dépendant du type cellulaire, suggérant que les différentes cellules ont des rôles biologiques différents dans la reproduction (Evans *et al.*, 2014). Nos résultats suggèrent que les cellules épithéliales des glandes endométriales moyennes et profondes pourraient constituer la principale source de MPO intrinsèque dans l'utérus de la jument. Dans ces cellules, l'immunomarquage cytoplasmique diffus était homogène et renforcé au niveau apical (Figure 2.4C). C'est à ce niveau que se trouvent les vésicules sécrétoires (Tunón *et al.*, 1995). Cette localisation de la MPO, associée au fait que les sécrétions intra-utérines présentent également un fort immunomarquage, est cohérente avec une synthèse intracellulaire et une sécrétion intraluminale de la protéine (Kolm *et al.*, 2006, Schöniger *et al.*, 2013). Par ailleurs, ce même profil d'immunomarquage a été également observé pour d'autres protéines sécrétées dans la lumière utérine de la jument (Kolm *et al.*, 2006, Hoffmann *et al.*, 2009a, Schöniger *et al.*, 2018), tant à caractère microbicide (Kolm *et al.*, 2006) qu'immunomodulateur (Schöniger *et al.*, 2018), ou comme composant de l'histotrophe (Hoffmann *et al.*, 2009a).

Le profil d'immunomarquage que nous avons observé dans l'épithélium luminal, ainsi qu'occasionnellement dans les parties droites des glandes, différait de celui présent dans les glandes moyennes et profondes. Dans l'épithélium luminal, le marquage immunohistochimique de la MPO était très hétérogène et variait fortement d'une jument à l'autre, ce qui pourrait indiquer que sa présence au sein de cette sous-population cellulaire est plutôt inconstante. Nos travaux de recherche ne nous ont pas permis de déterminer l'origine exacte des différences d'intensité de cet immunomarquage. Cependant, deux hypothèses peuvent être envisagées : l'internalisation de la MPO par les cellules épithéliales de la lumière

utérine ou la synthèse *de novo* de l'enzyme par ces mêmes cellules. En effet, l'immunoréaction cytoplasmique diffuse observée dans les cellules épithéliales de la lumière utérine pourrait être en faveur d'une internalisation de l'enzyme (Yang *et al.*, 2001, Haegens *et al.*, 2008, Ceusters *et al.*, 2013, Jerke *et al.*, 2013, Schöniger *et al.*, 2017). De plus, les deux profils d'immunomarquage observés dans l'épithélium luminal suggèrent la possible coexistence de deux mécanismes distincts d'absorption de la MPO. D'une part, dans les zones où des neutrophiles sous- ou trans-épithéliaux étaient présents, une coloration homogène des cellules épithéliales environnantes était systématiquement observée, tandis qu'aucune coloration n'était détectée dans les zones sans neutrophiles (Figure 2.4D). Ce profil d'immunomarquage pourrait refléter une absorption de la MPO via un contact cellule à cellule avec les neutrophiles, phénomène démontré *in vitro* dans des cellules endothéliales (Jerke *et al.*, 2013). D'autre part, l'internalisation de la MPO directement captée du milieu extracellulaire a également été démontrée dans les cellules endothéliales (Yang *et al.*, 2001, Jerke *et al.*, 2013) et les cellules épithéliales pulmonaires (Yang *et al.*, 2001, Haegens *et al.*, 2008). Nous proposons que ce mécanisme d'internalisation soit également présent dans l'épithélium luminal, comme le suggèrent les colorations d'intensité variable, dites en mosaïque, observées dans les zones de l'épithélium où la MPO était détectée en l'absence de neutrophiles (Figure 2.4B, G). Ce type d'internalisation a été suggéré pour les TLR comme un mécanisme de protection, afin de prévenir des réponses inflammatoires excessives dans l'utérus de la jument (Schöniger *et al.*, 2017). Un raisonnement similaire pourrait s'appliquer à la MPO car, malgré son rôle protecteur, lorsqu'elle est surabondante ou libérée en excès dans le milieu extracellulaire, les capacités oxydantes des produits de la MPO peuvent être néfastes pour les cellules et tissus hôtes (Klebanoff, 2005). Nous ne pouvons cependant pas exclure une production induite de la MPO sous forme de protéines par les cellules de l'épithélium luminal (Schöniger *et al.*, 2017). L'absence de MPO dans certaines zones ou cellules, alors que d'autres sont marquées, pourrait être cohérente avec une expression de l'ARNm, soit constitutive, soit induite, la synthèse protéique ne se produisant qu'en réponse à un stimulus spécifique. Cette hypothèse pourrait être liée à la capacité observée chez des cellules autres que les cellules myéloïdes à synthétiser de la MPO face à un stress oxydant (La Rocca *et al.*, 2009). En effet, il semblerait que la MPO n'ait pas été détectée dans les cellules endothéliales humaines saines en culture, mais qu'un marquage immunohistochimique ait été détecté dans toutes les cellules lorsqu'elles sont exposées à H_2O_2 . La présence d'ARNm codant pour la MPO, uniquement après exposition, confirme la synthèse *de novo* de la MPO par ces cellules (La Rocca *et al.*, 2009). La synthèse induite de la MPO par les cellules de l'épithélium luminal chez la jument pourrait donc être une réponse face à des contaminations éventuelles, auxquelles leur

localisation les expose en première ligne. Cette synthèse permettrait de neutraliser les agents contaminants sans déclencher de réponse inflammatoire systématique à chaque contact. Cependant, nos études ne nous ont pas permis de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Notre recherche s'est concentrée sur la détection de la MPO en tant que protéine plutôt que sur l'expression du gène codant pour la MPO, car c'est la présence de la protéine elle-même, issue de sa traduction à partir de l'ARNm, qui détermine sa fonction biologique. Grâce à l'immunohistochimie, nous avons pu localiser la MPO dans l'endomètre de la jument, constituant ainsi une première étape vers sa caractérisation dans cet organe. Sa détection dans l'endomètre suggère fortement une synthèse *de novo* de l'enzyme au niveau des glandes, avec une sécrétion dans la lumière utérine en œstrus. La qualité des préparations immunohistochimiques a été confirmée par l'immunoréactivité intense des neutrophiles dans tous les échantillons de tissu utérin analysés, y compris ceux en anœstrus, où aucune coloration des cellules endométriales n'a été observée. Cependant, pour renforcer ces observations, l'extraction et l'amplification de l'ARNm codant pour la MPO par RT-qPCR, ainsi que l'utilisation de la méthode FISH (*Hybridation In Situ Fluorescente*), et potentiellement l'approche du single-cell RNA sequencing et/ou single cell proteomics, seraient nécessaires. Ces approches permettront de valider la synthèse de la MPO par les cellules épithéliales glandulaires et de confirmer ou étayer l'hypothèse de capture et d'internalisation de l'enzyme par l'épithélium luminal, ainsi que d'explorer d'autres hypothèses possibles telles que la captation de l'ARNm et une traduction locale de la MPO par les cellules ou la captation de la MPO par contact des cellules avec les NETs.

Nos études étaient les premières à s'intéresser à la possible présence de la MPO dans la lumière utérine en général, et plus spécifiquement chez le cheval. La MPO a été utilisée auparavant comme marqueur d'inflammation dans l'utérus chez la souris (Zhang *et al.*, 2017) et la rate (Alataş *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2015), sans toutefois être étudiée dans des conditions physiologiques. Les auteurs de ces études se sont basés sur l'affirmation longuement acceptée que la présence de MPO est un indicateur certain de l'activation des neutrophiles. Néanmoins, à l'instar de ce que nous avons observé chez la jument, la MPO est déjà présente dans l'endomètre murin avant l'induction d'une inflammation systémique (Yang *et al.*, 2015). En effet, un immunomarquage de la MPO est présent dans des coupes utérines de rate, avant une injection de LPS, non seulement dans les neutrophiles, mais également dans les cellules épithéliales de l'endomètre (Yang *et al.*, 2015). Les auteurs de cette étude n'ont pas abordé ce marquage dans leur discussion, probablement parce qu'ils l'attribuent à la présence

physiologique des neutrophiles dans l'utérus murin et non à une synthèse endogène par les cellules épithéliales. Cependant, cet immunomarquage semble très similaire à celui que nous avons observé chez la jument en œstrus et pourrait ainsi indiquer une présence physiologique de la MPO dans l'utérus chez la rate (Yang *et al.*, 2015). Dans une autre étude chez la souris (Zhang *et al.*, 2017), la MPO n'était détectée avant l'induction d'une infection bactérienne que dans les neutrophiles et les cellules mononucléées de la *lamina propria*. En revanche, après infection, l'immunomarquage était également présent dans les cellules épithéliales de la surface de l'endomètre, et pas uniquement dans les cellules inflammatoires. Outre les possibles différences physiologiques entre espèces, cette divergence entre les études pourrait s'expliquer par le fait que la phase du cycle n'a pas été prise en compte. Chez la jument, nos travaux montrent clairement que la MPO est exprimée dans l'endomètre de manière cyclique, avec une régulation positive en présence d'œstrogènes et en absence de progestérone. Bien que le profil d'expression de la MPO demeure inexploré dans l'endomètre murin, la régulation des peroxydases (Houdeau *et al.*, 2005), ainsi que d'autres molécules antimicrobiennes (Walmer *et al.*, 1992, Kolm *et al.*, 2006), est similaire à celle de la MPO chez la jument. Il est donc raisonnable de supposer que la cyclicité hormonale pourrait également influencer la présence de la MPO dans l'endomètre de la souris et de la rate, expliquant potentiellement les variations observées entre les études. Une autre étude montre une diminution de la concentration de MPO dans l'endomètre chez la rate après un traitement de 14 jours avec de l'octréotide (Alataş *et al.*, 2000), un analogue de la somatostatine de longue durée d'action. Ce résultat a été interprété par les auteurs comme un effet suppresseur de l'activation des neutrophiles par la molécule étudiée, affectant ainsi le système immunitaire de l'utérus chez la rate. Il est cependant important de noter que, bien que ce résultat ne soit pas abordé dans leur discussion, la concentration en élastase, une autre enzyme pro-inflammatoire contenue dans les mêmes granules que la MPO et utilisée comme marqueur d'activation neutrophile, n'était pas affectée par le traitement (Alataş *et al.*, 2000). Cette absence de corrélation entre les concentrations de MPO et d'élastase a également été observée dans le sperme équin après congélation (Ponthier *et al.*, 2010), ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle l'origine de la MPO utérine n'est pas exclusive des neutrophiles. Les résultats obtenus à partir des études concernant l'utérus murin (Alataş *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2017) apportent un soutien à notre hypothèse d'une origine endométriale de la MPO.

Néanmoins, en anœstrus, la MPO utérine chez la jument semble avoir une origine différente, probablement et majoritairement issue des neutrophiles. Dans cette phase, une atrophie endométriale existe (Kenney, 1978), inhibant la synthèse et la sécrétion des protéines par les cellules épithéliales. Cela pourrait expliquer l'absence de marquage immunohistochimique de

la MPO dans l'endomètre en anœstrus. Le nombre physiologique de neutrophiles dans l'utérus des juments en anœstrus n'a jamais été investigué. Par conséquent, le même seuil inflammatoire que celui appliqué en diœstrus est souvent utilisé. Cependant, en l'absence des œstrogènes, qui favorisent la margination des neutrophiles et l'augmentation de la vascularisation (Grant-Tschudy et Wira, 2004), ou de la progestérone, qui empêche la migration des neutrophiles (Watson *et al.*, 1987a), l'endomètre en anœstrus pourrait être considéré similaire à toute autre muqueuse de l'organisme, avec des neutrophiles présents de manière constitutive comme cellules sentinelles du système immunitaire (Chadwick *et al.*, 2021). Nous émettons l'hypothèse qu'en anœstrus, les neutrophiles, et non les cellules épithéliales, constituent la source principale de la MPO utérine.

2.3 Rôle de la MPO utérine dans les mécanismes de défense de l'utérus

La présence de la MPO utérine et sa localisation dans les glandes endométriales constituent une découverte inattendue, mais qui s'inscrit logiquement dans le cadre de ses fonctions connues. En rassemblant les informations obtenues dans nos travaux de recherche et en considérant le rôle principal de la MPO dans l'immunité innée en tant qu'agent microbicide puissant (Klebanoff, 2005), la probabilité que la MPO fasse partie intégrante du système immunitaire des muqueuses, jouant un rôle dans la protection de l'utérus, indépendamment de l'inflammation, est très élevée. Il convient de rappeler que les cellules épithéliales de l'endomètre contribuent aux mécanismes de défense des muqueuses (Wira *et al.*, 2005b). Outre leur rôle de barrière physique, elles agissent également comme cellules sentinelles dans l'endomètre (Wira *et al.*, 2005b) et assurent la synthèse et la sécrétion de diverses molécules dans la lumière utérine, qui participent activement à la protection de l'utérus (Kolm *et al.*, 2006, Marth *et al.*, 2016a, Schöniger *et al.*, 2016, Schöniger *et al.*, 2017, Marth *et al.*, 2018, Schöniger *et al.*, 2018). Parmi ces molécules, on retrouve des agents antimicrobiens qui inhibent la prolifération des pathogènes potentiels (Wira et Fahey, 2004). La MPO pourrait en faire partie. Bien que cette hypothèse ne soit pas encore confirmée, nous suggérons que la MPO utérine participe aux mécanismes de tolérance du système immunitaire de la muqueuse endométriale. Roumeguère *et al.* (2023) ont récemment proposé que la MPO, détectée dans leurs études au sein des cellules épithéliales des glandes sécrétoires de la prostate (Roumeguère *et al.*, 2012, Roumeguère *et al.*, 2023), pourrait jouer un rôle antiseptique dans le plasma séminal en conditions physiologiques, similaire à celui de la lactoperoxydase dans le lait ou la salive. De manière similaire, il est possible que la MPO utérine participe, en conditions physiologiques, à neutraliser les microorganismes potentiels qui pourraient éventuellement arriver dans l'utérus en œstrus, empêchant ainsi leur prolifération et donc leur colonisation. Elle pourrait ainsi

contribuer à maintenir l'homéostasie utérine et prévenir une réponse inflammatoire lors des contaminations éventuelles pendant la longue période d'œstrus chez la jument, lorsque le col est ouvert et détendu et que la contamination ascendante est facilitée.

Il est également envisageable qu'en œstrus, la présence constante de MPO dans les cellules des glandes utérines contribue à conférer à l'utérus une défense immunitaire immédiate face aux contaminations lorsque les mécanismes de tolérance sont dépassés. Bien que la littérature ne fournit pas encore d'informations sur l'expression du gène codant pour la MPO dans les cellules endométriales, l'expression d'autres gènes impliqués dans la production de molécules antimicrobiennes a été étudiée dans l'endomètre de la jument après une inoculation bactérienne d'*Escherichia coli* (Marth *et al.*, 2016a). L'expression de certains de ces gènes est rapidement régulée à la hausse par rapport aux niveaux physiologiques observés avant l'infection. Cette augmentation semble dépendre toutefois de la molécule étudiée, probablement en raison de sa spécificité antimicrobienne vis-à-vis du microorganisme inoculé ainsi que de sa concentration initiale avant l'inoculation (Marth *et al.*, 2016a). Nous suggérons que, au-delà de son rôle dans les mécanismes de tolérance, la MPO pourrait participer, en synergie avec d'autres molécules, aux mécanismes de résistance de la muqueuse endométriale. Par ailleurs, dans une étude sur le diagnostic d'endométrite chez la vache en post-partum, les niveaux de MPO détectés par ELISA à partir d'échantillons prélevés par cytologie n'étaient pas corrélés au nombre de neutrophiles présents dans la lumière utérine (Nazhat *et al.*, 2018). Malgré le faible nombre d'animaux inclus pour le dosage de la MPO et l'absence d'informations sur la phase du cycle au moment du prélèvement, ces résultats suggèrent qu'en conditions inflammatoires, la MPO ne proviendrait pas exclusivement des neutrophiles. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'en revanche, le nombre des neutrophiles était bien corrélé avec les valeurs de l'estérase leucocytaire, une enzyme également contenue et libérée par les neutrophiles (Nazhat *et al.*, 2018), dont la concentration a été proposée comme méthode diagnostique d'endométrite subclinique en post-partum chez la vache (Couto *et al.*, 2013). Toutefois, des études fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer notre hypothèse et démontrer la régulation de la synthèse et la sécrétion de la MPO utérine en cas d'endométrite, qu'elle soit infectieuse ou non.

2.4 Variabilité de la concentration de la MPO utérine

Nos études ne nous ont pas permis de déterminer si la sécrétion de MPO dans la lumière utérine en œstrus est constitutive, induite par un stimulus spécifique, ou résulte d'une combinaison des deux. Dans l'étude de Yang *et al.* (2015), le marquage immunohistochimique de la MPO, initialement présente dans l'endomètre des rates, diminue lorsqu'une inflammation avec du LPS est induite. Cette diminution pourrait s'expliquer par une libération de la MPO intracytoplasmique dans la lumière utérine en réponse à l'inflammation provoquée par le LPS. Cette hypothèse pourrait en partie expliquer l'absence de corrélation entre l'intensité de l'immunomarquage (IRS) et la concentration intraluminale de MPO dans nos échantillons physiologiques. Ces observations suggèrent que la MPO exprimée par l'endomètre est susceptible d'être rapidement mobilisée et que sa sécrétion dans la lumière utérine pourrait être activée par des stimuli spécifiques. Ainsi, la présence constante de MPO dans le liquide utérin des juments saines en œstrus pourrait provenir d'une sécrétion stimulée par le microbiote ou par d'autres mécanismes encore inconnus, visant à maintenir l'homéostasie utérine. Néanmoins, la possibilité d'une sécrétion basale constitutive de MPO dans la lumière utérine en absence d'inflammation ne peut être exclue à ce jour.

En cohérence avec l'immunomarquage endométrial cyclique, les concentrations en MPO dans le liquide utérin étaient plus élevées en œstrus qu'en diœstrus. Il est plausible de supposer que les concentrations mesurées en diœstrus représentent une partie de la MPO sécrétée au cours de l'œstrus, qui est en train d'être évacuée. Les variations de concentration observées entre les juments pourraient être attribuées, d'une part, au moment du prélèvement par rapport à la phase du cycle et, donc, aux fluctuations hormonales cycliques mais aussi individuelles. Nos résultats ne nous permettent cependant pas de confirmer cette hypothèse. Il serait nécessaire de doser la MPO sur des prélèvements effectués tout au long du cycle œstral sur les mêmes individus, en parallèle avec des mesures des concentrations des hormones stéroïdiennes, tant pour valider cette hypothèse que pour contribuer à une meilleure caractérisation de la MPO utérine chez la jument. D'autre part, l'accumulation intraluminale de MPO au fil des cycles successifs et/ou d'endométrites antérieures pourrait également expliquer ces différences observées entre les juments. Dans notre première étude, l'accumulation de liquide intraluminal était associée à des concentrations plus élevées de MPO chez les juments en œstrus. Un drainage insuffisant du liquide par le col de l'utérus et/ou le système lymphatique pourrait réduire l'élimination de la MPO de l'utérus et favoriser ainsi son accumulation d'un cycle à l'autre. De ce fait, la capacité individuelle des juments à éliminer la MPO de la lumière utérine pourrait expliquer les concentrations très élevées dans certains

échantillons, tandis que dans d'autres, les concentrations de l'enzyme étaient basses, même inférieures à la limite de détection du test.

2.5 Activité enzymatique de la MPO utérine

Étant donné les effets potentiellement délétères d'une accumulation excessive ou inappropriée de MPO et de ses produits oxydants sur les cellules et tissus hôtes (Klebanoff, 2005, Davies et Hawkins, 2020), la présence constante de MPO dans la lumière utérine soulève la question de sa possible contribution au développement de certaines affections endométriales (Rebordão *et al.*, 2018, Rebordão *et al.*, 2021).

Cependant, ce n'est pas la simple présence de la MPO en tant que protéine, mais bien son activité enzymatique, via la production des espèces réactives de l'oxygène, qui pourrait être néfaste pour le tissu endométrial. Les effets délétères de la MPO sur les tissus et les organes sont principalement associés à la production d'HOCl, un oxydant puissant généré à partir du Cl⁻ (Davies et Hawkins, 2020), capable d'oxyder et de chlorer de nombreuses molécules. Le Cl⁻ constitue le substrat le plus abondant pour la MPO dans le plasma (Furtmüller *et al.*, 1998). Cependant, il serait intéressant d'étudier son abondance et celle des autres substrats de la MPO dans la lumière utérine. Bien qu'il n'ait pas encore été étudié dans l'utérus, le SCN⁻ est sécrété par les cellules épithéliales de différentes muqueuses (Arnhold, 2021). En l'absence d'inflammation, sa présence pourrait favoriser la formation de HOSCN par la MPO plutôt que d'agents oxydants plus agressifs, jouant ainsi un rôle dans le contrôle des microorganismes à la surface de la muqueuse utérine tout en limitant les dommages aux tissus endométriaux. Cette hypothèse reste toutefois à vérifier et, des études sont nécessaires pour évaluer la présence et la caractérisation du pseudo-halogénure SCN⁻ dans l'utérus des juments, ainsi que les produits résultant de ses réactions avec la MPO, afin de la valider. Il convient également de noter que cette hypothèse pourrait ne pas s'appliquer en cas d'endométrite, où les modifications du pH et de la disponibilité des substrats pourraient favoriser la production d'acides hypohaleux plus agressifs (Furtmüller *et al.*, 1998).

Cependant, dans notre deuxième étude, nous avons également investigué l'activité enzymatique de la MPO utérine et nos résultats indiquent que la MPO présente dans le liquide utérin est majoritairement inactive. Cette observation pourrait être comparée à ce qui a été rapporté dans le cerveau humain, où la MPO, bien qu'étant généralement active dans les tissus, présente une activité peroxydase peu marquée dans le liquide cérébrospinal (Green *et al.*, 2004). Bien que nous n'ayons pas encore pu confirmer l'activité de la MPO dans

l'endomètre de la jument, sa présence sous une forme active dans ce tissu reste une hypothèse plausible à investiguer. Les variations de l'activité de la MPO selon les phases du cycle reproducteur suggèrent la présence de facteurs de régulation dans le liquide utérin, équilibrant l'activité de la MPO en fonction des besoins de l'endomètre pour chaque situation reproductive, permettant de maintenir l'homéostasie et de limiter les effets néfastes pour les cellules et les tissus hôtes. Une fraction significative de la MPO est inactivée au cours de la phagocytose lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire (Bradley *et al.*, 1982, Edwards *et al.*, 1987), mais les mécanismes d'inhibition impliqués ne sont pas encore clairs. Par ailleurs, certaines molécules sont capables d'inhiber la MPO plasmatique par différents mécanismes et à différents degrés (Klebanoff, 1979, King *et al.*, 1997, Galijasevic *et al.*, 2008a, b) mais, à notre connaissance, elles n'ont pas encore été étudiées dans le liquide utérin. Dans leurs travaux sur le sperme frais équin, Ponthier *et al.* (2014), ont observé par Western Blot que la MPO présente dans le surnageant après centrifugation était majoritairement sous forme de précurseur (86 kDa), inactif chez le cheval (Franck *et al.*, 2005) contrairement à ce qui est observé chez l'humain (Klebanoff, 2005). Des bandes de plus petite taille ont également été identifiées, qui, selon les auteurs, pourraient correspondre à la chaîne légère de l'enzyme native (16 kDa) ainsi qu'à des produits de dégradation de la sous-unité lourde de la MPO (64 kDa).

Bien que dans nos études nous avons utilisé un anticorps anti-MPO polyclonal, spécifique aux équidés, ce qui généralement augmente la sensibilité de détection, il peut aussi en diminuer la spécificité. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que la MPO détectée dans la lumière utérine soit présente sous diverses formes et pas uniquement sous sa forme native, active ou inactivée. Il est plausible que la concentration de MPO détectée dans la lumière utérine des juments saines soit un reflet de la MPO préalablement sécrétée dans la lumière utérine, puis inactivée ou dégradée après avoir réalisé sa fonction. En s'appuyant sur les observations rapportées dans des cellules d'ovaire de hamster de Chine (cellules CHO), où la hrMPO est produite sous forme d'un monomère (Moguilevsky *et al.*, 1991) et non d'un dimère (Serteyn *et al.*, 2003), Noyon (2017) a avancé l'hypothèse que la synthèse de la MPO localisée dans les cellules épithéliales prostatiques pourrait différer de celle des cellules myéloïdes, ce qui pourrait entraîner une structure et une activité distinctes de la MPO sécrétée par les neutrophiles. De plus, les peroxydases des mammifères partagent une séquence commune de 500 résidus d'acides aminés (Kargapolova *et al.*, 2021), ce qui rend possible que l'anticorps utilisé dans notre étude réagisse également avec d'autres peroxydases de cette famille, potentiellement présentes dans les sécrétions utérines ou les cellules endométriales chez la jument. Une étude récente révèle l'expression du gène codant pour la peroxydase

thyroïdienne ainsi que sa présence dans l'endomètre de la femme (Rahnama *et al.*, 2021), tandis que la lactoperoxydase, bien documentée dans de nombreuses muqueuses de l'organisme où elle exerce une protection immunitaire (Arnhold, 2021), n'a pas encore été rapportée dans l'utérus. En outre, le peroxidasin, une peroxydase appartenant à la famille 2 des peroxydases animales, présentant une forte homologie de séquence avec la MPO (Paumann-Page *et al.*, 2024) et impliqué dans la stabilisation de la matrice extracellulaire, a été identifié dans le protéome utérin chez la jument (Maloney *et al.*, 2019). Il serait pertinent de réaliser une analyse par Western Blot, tant en conditions physiologiques qu'en cas d'endométrite, afin de déterminer sous quelles formes la MPO est présente dans l'utérus et dans quelles situations, pour mieux la caractériser et comprendre sa fonction dans cet organe.

3. MPO DANS DES SITUATIONS PATHOLOGIQUES UTÉRINES

Une **troisième** étude réalisée dans le cadre de cette thèse nous a permis d'avoir un premier aperçu concernant l'effet que l'endomérose pourrait avoir sur la détection de la MPO. En s'appuyant sur nos hypothèses concernant le possible rôle de la MPO dans les mécanismes de tolérance du système immunitaire des muqueuses, une altération de la présence de la MPO pourrait avoir un impact sur la défense immunitaire de l'utérus.

La capacité à mener une gestation à terme diminue chez les juments souffrant d'endomérose, une diminution qui augmente avec la sévérité des lésions (Kenney et Doig, 1986). Une hypothèse pour expliquer cette baisse de fertilité repose sur la diminution de l'abondance de certaines protéines observée dans les sécrétions utérines (Diel de Amorim *et al.*, 2020). Ces protéines, essentielles au développement embryonnaire, présentent un profil d'immunomarquage endométrial altéré en cas d'endomérose (Hoffmann *et al.*, 2009b). De manière similaire, la présence réduite, voire absente, de la MPO observée dans notre étude, comparée à celle attendue lors de l'œstrus, bien que mesurée sur un nombre limité d'échantillons, suggère que l'endomérose pourrait perturber l'environnement immunitaire de l'utérus. Un déficit des mécanismes de tolérance utérine pourrait contribuer à augmenter la susceptibilité des juments à développer une endométrite. Chez les juments considérées comme susceptibles, l'expression du gène codant pour la chimiokine CCL2, ainsi que pour certaines molécules antimicrobiennes, telles que la phospholipase A2 sécrétée, la lipocaline 2, la lactoferrine, la β -défensine équine 1, le lysozyme et l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire est plus élevée que chez les juments résistantes avant la saillie (Marth *et al.*, 2018). Une stimulation constante, bien que de faible intensité, de la muqueuse endométriale due à l'incapacité des mécanismes de tolérance à éviter une réponse inflammatoire

systématique face aux antigènes externes auxquels l'utérus est exposé, notamment lors de l'œstrus, pourrait expliquer ces observations. De plus, une inflammation chronique, même de faible intensité, pourrait altérer les mécanismes régulant l'expression de certaines molécules inflammatoires, ce qui pourrait contribuer au retard de la réponse inflammatoire observé chez les juments susceptibles (Woodward *et al.*, 2013a).

Différents études ont utilisé le degré d'endométreose comme critère pour classifier les juments en susceptibles ou résistantes à développer une endométrite (Woodward *et al.*, 2012, Woodward *et al.*, 2013a, Woodward *et al.*, 2013b). Néanmoins, il a été suggéré que la MPO pourrait être impliquée dans le développement de la fibrose dans l'endomètre équin (Rebordão *et al.*, 2018, Rebordão *et al.*, 2021). Nous avons montré que les juments atteintes d'endométrite présentent des concentrations de MPO significativement plus élevées que celles où aucune inflammation n'a été observée. Néanmoins, les juments nullipares, dont l'utérus n'a jamais été exposé à du sperme durant toute leur vie reproductive, développent également une fibrose endométriale dont la sévérité est corrélée à l'âge (Ricketts et Alonso, 1991). Cela suggère que la présence constitutive et la sécrétion de MPO par les cellules épithéliales endométriales au cours de la vie reproductive, ainsi que la MPO issue des neutrophiles sentinelles pendant l'ancœstrus, pourraient contribuer à la progression naturelle de la fibrose endométriale, tandis que l'exposition à l'inflammation, en particulier si elle est persistante, entraînant la libération accrue de MPO, pourrait accélérer et/ou aggraver ce processus. Ainsi, un cercle vicieux semble se dessiner entre ces deux entités pathologiques. Ces observations renforcent l'importance d'améliorer les connaissances sur le système immunitaire de la muqueuse endométriale.

CONCLUSIONS

Les travaux de recherche conduits dans le cadre de cette thèse nous ont amenés à plusieurs conclusions.

La MPO est détectable par la méthode ELISA dans le liquide des lavages utérins chez la jument, et ce, dans toutes les phases du cycle reproducteur, avec des concentrations très variables. Les concentrations de MPO sont significativement plus élevées chez les juments en œstrus atteintes d'endométrite que chez les juments saines, ce qui confirme que la MPO pourrait constituer un biomarqueur d'inflammation utérine.

Les neutrophiles ne représentent pas la seule source de MPO détectée dans le liquide des lavages utérins. Chez la jument, il existe une MPO intrinsèque à l'utérus, indépendante du processus inflammatoire, localisée dans les cellules épithéliales de l'endomètre. Le profil d'immunomarquage observé indique que, dans des conditions physiologiques, les glandes utérines constituent la principale source de la MPO utérine. Dans l'épithélium luminal, son immunomarquage est plus hétérogène, ce qui, selon les premières observations, pourrait refléter une internalisation plutôt qu'une synthèse *de novo* de l'enzyme, bien que cette dernière possibilité ne puisse pas être exclue.

La présence de la MPO utérine dans l'endomètre est cyclique et probablement régulée par les hormones stéroïdiennes via leurs récepteurs. À l'instar d'autres molécules impliquées dans l'immunité endométriale, la MPO utérine est détectée en œstrus, ce qui, dans des conditions physiologiques, indiquerait qu'elle joue un rôle protecteur plutôt que défensif dans l'utérus de la jument. Les concentrations de MPO dans le liquide des lavages utérins suivent également une tendance cyclique, avec des niveaux plus élevés durant l'œstrus par rapport au diœstrus, ce qui suggère qu'une sécrétion basale, induite ou constitutive, est probablement présente en œstrus.

La majorité de la MPO détectée dans le liquide des lavages utérins, dans des conditions physiologiques, n'est pas enzymatiquement active, probablement en raison de mécanismes inhibiteurs destinés à protéger les tissus endométriaux des effets potentiellement délétères liés à l'activité de l'enzyme. Il est également possible que la MPO dans le liquide utérin soit présente sous des formes différentes de l'enzyme native, et que ces formes, ainsi que les produits de dégradation de la MPO, contribuent à l'absence d'activité enzymatique observée. Cela rend impératif le dosage parallèle de la MPO totale et active dans l'étude de cette molécule dans le liquide utérin chez la jument.

Discussion Générale

Chez des juments atteintes d'endométrose, la détection de la MPO utérine durant l'œstrus est réduite, voire absente, dans les glandes utérines affectées par de la fibrose endométriale. Il est très probable que, faisant partie intégrante du système immunitaire de la muqueuse endométriale, la MPO utérine participe aux mécanismes de tolérance de l'utérus, contribuant à prévenir l'infection et à éviter l'inflammation pendant cette phase du cycle, lorsque l'exposition aux contaminations externes est plus élevée. Un environnement immunitaire local déficient pourrait compromettre la capacité de l'utérus à faire face à d'éventuelles contaminations, avec des conséquences potentielles sur la fertilité de la jument.

Les concentrations de MPO dans le liquide des lavages utérins varient considérablement entre les juments. Cette variabilité pourrait s'expliquer par l'accumulation de MPO provenant de cycles successifs et/ou d'endométrites antérieures, ainsi que par la capacité individuelle de chaque jument à éliminer la MPO, dans ces différentes formes, de la lumière utérine.

En anœstrus, l'immunomarquage de la MPO est absent dans les cellules endométriales. Dans cette phase du cycle reproducteur, où l'utérus n'est pas sous influence hormonale, l'endomètre doit être considéré comme toute autre muqueuse de l'organisme, avec les neutrophiles comme principale source de MPO détectée dans la lumière utérine.

PERSPECTIVES

Ce premier regard sur la MPO utérine apporte des interrogations concernant le système de défense de l'utérus chez la jument et ouvre des perspectives intéressantes sur de futures recherches :

- 1) Avant de remettre en question l'idée largement acceptée selon laquelle la MPO est exclusivement synthétisée par les cellules myéloïdes, et d'affirmer qu'elle l'est également par les cellules endométriales, des investigations complémentaires sont nécessaires. Il serait pertinent de vérifier si ces cellules transcrivent le gène codant pour la MPO par RT-qPCR ou FISH, ainsi que si la protéine est effectivement traduite, en fonction du type cellulaire, notamment en exposant des cultures cellulaires endométriales aux œstrogènes. Néanmoins, des approches comme le single-cell RNA sequencing et/ou le single-cell proteomics seraient les plus appropriées pour confirmer ces résultats avec précision.
- 2) Les formes sous lesquelles la MPO est présente dans l'utérus de la jument méritent également d'être investiguées, tant pour évaluer leur impact potentiel sur la reproduction que leur utilité comme outil diagnostique de l'endométrite. Bien que les travaux de cette thèse aient permis d'identifier la présence de la MPO, il est possible que d'autres peroxydases soient également présentes dans l'utérus de la jument et aient pu influencer les résultats. Une peroxydase utérine a d'ailleurs été mentionnée dans la littérature, mais les études n'ont pas encore confirmé s'il s'agit d'une nouvelle peroxydase jusqu'ici inconnue ou une des peroxydases déjà identifiées. Il serait donc pertinent d'explorer la présence d'autres peroxydases dans le cadre de futures recherches.
- 3) Il serait particulièrement intéressant de conduire des études fonctionnelles *in vitro* et *ex vivo* pour mieux comprendre le rôle de la MPO dans l'utérus de la jument et son impact sur la reproduction. L'utilisation de cultures cellulaires endométriales et d'organoïdes utérins permettrait de modéliser plus précisément l'expression et l'activité de la MPO dans un environnement contrôlé. De plus, l'exposition de l'utérus sain à des stimuli, tels que la saillie et des infections induites, aiderait à comprendre le rôle de la MPO utérine dans les mécanismes de résistance de l'endomètre face aux contaminations externes.
- 4) Il serait également intéressant de déterminer si la MPO dans le tissu endométrial est enzymatiquement active, en conditions physiologiques, avant d'être sécrétée dans la lumière utérine. Cela constituerait une première étape nécessaire avant d'examiner les

inhibiteurs potentiels de la MPO dans le liquide utérin et les conditions dans lesquelles ils agissent. L'inhibition de la MPO suscite un intérêt croissant pour le traitement des processus inflammatoires exacerbées. Il est essentiel d'étudier la relation entre la présence de la MPO et son activité enzymatique dans les cas d'endométrite, persistante ou non, ainsi que chez les juments susceptibles, afin de déterminer la pertinence d'envisager son inhibition dans l'utérus.

- 5) Enfin, il serait pertinent d'étudier le marquage immunohistochimique de la MPO dans l'endomètre de juments atteintes de différents degrés et types d'endomérose, aux différentes phases du cycle, afin de mieux comprendre l'impact de cette affection endométriale sur la présence de MPO dans l'utérus.

Bibliographie

Bibliographie

- Adams, G. P., Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. (1987). "Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare." *Journal of reproduction and fertility Supplement* 35: 445-454.
- Akthar, I., Suarez, S. S., Morillo, V. A., Sasaki, M., Ezz, M. A., Takahashi, K.-i., Shimada, M., Marey, M. A., Miyamoto, A. (2020). "Sperm enter glands of preovulatory bovine endometrial explants and initiate inflammation." *Reproduction* 159(2): 181-192.
- Alataş, E., Alataş, O., Colak, O. (2000). "Octreotide inhibits myeloperoxidase activity in rat uterus." *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 79(7): 524-527.
- Alghamdi, A., Troedsson, M. H., Laschkewitsch, T., Xue, J. L. (2001). "Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro." *Theriogenology* 55(4): 1019-1028.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N. (2005). "Seminal DNase Frees Spermatozoa Entangled in Neutrophil Extracellular Traps." *Biology of reproduction* 73(6): 1174-1181.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Carlson, C. S., Troedsson, M. H. T. (2005). "Nitric Oxide Levels and Nitric Oxide Synthase Expression in Uterine Samples from Mares Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-induced Endometritis." *American journal of reproductive immunology* 53(5): 230-237.
- Alghamdi, A. S., Lovaas, B. J., Bird, S. L., Lamb, G. C., Rendahl, A. K., Taube, P. C., Foster, D. N. (2009). "Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding." *Animal reproduction science* 114(4): 331-344.
- Allen, W. R., Brown, L., Wright, M., Wilsher, S. (2007). "Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England." *Equine Veterinary Journal* 39(5): 438-445.
- Amaral, A., Fernandes, C., Rebordão, M. R., Szóstek-Mioduchowska, A., Lukasik, K., Pinto-Bravo, P., Gama, L. T. d., Skarzynski, D. J., Ferreira-Dias, G. (2021). "Myeloperoxidase inhibition decreases the expression of collagen and metallopeptidase in mare endometria under in vitro conditions." *Animals* 11(1): 1-13.
- Amos, M. R., Healey, G. D., Goldstone, R. J., Mahan, S. M., Düvel, A., Schuberth, H.-J., Sandra, O., Zieger, P., Dieuzy-Labaye, I., Smith, D. G. E., Sheldon, I. M. (2014). "Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle." *Biology of reproduction* 90(3): 54.
- Arnhold, J. (2021). "Heme peroxidases at unperturbed and inflamed mucous surfaces." *Antioxidants* 10(11): 1805.
- Arnold, J. T., Kaufman, D. G., Seppälä, M., Lessey, B. A. (2001). "Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model." *Human reproduction (Oxford)* 16(5): 836-845.

Art, T., Franck, T., Gangl, M., Votion, D., Kohnen, S., Deby-Dupont, G., Serteyn, D. (2006a). "Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition." *Equine veterinary journal Supplement*(36): 298-302.

Art, T., Franck, T., Lekeux, P., de Moffarts, B., Couëtil, L., Becker, M., Kohnen, S., Deby-Dupont, G., Serteyn, D. (2006b). "Myeloperoxidase concentration in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and those with recurrent airway obstruction." *Canadian journal of veterinary research* 70(4): 291-296.

Asbury, A. C., Halliwell, R. E., Foster, G. W., Longino, S. J. (1980). "Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis." *Theriogenology* 14(4): 299-308.

Atli, M. O., Kurar, E., Kayis, S. A., Aslan, S., Semacan, A., Celik, S., Guzeloglu, A. (2010). "Expression of Toll-like Receptors (TLRs) Is Regulated by Early Pregnancy in the Mare Endometrium." *Biology of Reproduction* 83(Suppl_1): 349-349.

Aurich, C. (2011). "Reproductive cycles of horses." *Animal reproduction science* 124(3): 220-228.

Austin, G., Zhao, W.-G., Adjiri, A., Lu, J.-P. (1996). "Control of myeloperoxidase gene expression in developing myeloid cells." *Leukemia research* 20: 817-820.

Ayres, J. S., Schneider, D. S. (2012). "Tolerance of Infections." *Annual Review of Immunology* 30(1): 271-294.

Baiza-Gutman, L. A., Flores-Sánchez, M. M., Díaz-Flores, M., Hicks, J. J. (2000). "Presence of uterine peroxidase activity in the rat early pregnancy." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32(2): 255-262.

Batra, S. C., Losif, C. S. (1992). "Effect of estrogen treatment on the peroxidase activity and estrogen receptors in the female rabbit urogenital tissues." *The Journal of urology* 148(3): 935-938.

Battut, I., Colchen, S., Fieni, F., Tainturier, D., Bruyas, J. F. (1997). "Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation." *Equine Veterinary Journal* 29(S25): 60-62.

Békési, G., Kakucs, R., Varbiro, S., Feher, J., Pazmany, T., Magyar, Z., Sprintz, D., Szekacs, B. (2001). "Induced myeloperoxidase activity and related superoxide inhibition during hormone replacement therapy." *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 108(5): 474-481.

Bollwein, H., Sowade, C., Stolla, R. (2003). "The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares." *Theriogenology* 60(4): 607-616.

Bradley, P. P., Christensen, R. D., Rothstein, G. (1982). "Cellular and Extracellular Myeloperoxidase in Pyogenic Inflammation." *Blood* 60(3): 618-622.

Bregón-Villahoz, M., Moragues, M.-D., Arrieta-Aguirre, I., Azkargorta, M., Lainz, L., Diez-Zapirain, M., Iglesias, M., Prieto, M.-B., Matorras, A., Exposito, A., Elortza, F., Matorras, R. (2021). "Antibacterial and Antifungal Activity of the Human Endometrial Fluid during the Natural Cycle." *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* 2021: 1-9.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). "Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria." *Science* 303(5663): 1532-1535.

Brinsko, S., Rigby, S. L., Varner, D., Blanchard, T. L. (2003). "A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis". *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, New Orleans, Louisiana, 49: 363-365.

Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., Hartman, D. L. (2011a). Chapter 2 - Reproductive Physiology of the Nonpregnant Mare. *Manual of Equine Reproduction* (Third Edition). S. P. Brinsko, T. L. Blanchard, D. D. Varner et al. Saint Louis, Mosby: 10-18.

Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., Hartman, D. L. (2011b). Chapter 6 - Endometritis. *Manual of Equine Reproduction* (Third Edition). S. P. Brinsko, T. L. Blanchard, D. D. Varner et al. Saint Louis, Mosby: 73-84.

Burleson, M. D., LeBlanc, M. M., Riddle, W. T., Hendricks, K. E. (2010). "Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares." *Animal Reproduction Science* 121: 103.

Cadario, M. E., Thatcher, M.-J. D., LeBlanc, M. M. (2018). "Relationship between Prostaglandin and Uterine Clearance of Radiocolloid in the Mare1." *Biology of Reproduction* 52(monograph_series1): 495-500.

Campbell, M. L. H., England, G. C. W. (2004). "Effect of teasing, mechanical stimulation and the intrauterine infusion of saline on uterine contractions in mares." *Veterinary record* 155(4): 103-110.

Canisso, I. F., Segabinazzi, L., Fedorka, C. E. (2020). "Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology." *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1432.

Causey, R. C. (2007). "Mucus and the mare: How little we know." *Theriogenology* 68(3): 386-394.

Cazales, N., Estradé, M. J., Pereyra, F., Fiala-Rechsteiner, S. M., Mattos, R. C. (2020). "Sperm transport and endometrial inflammatory response in mares after artificial insemination with cryopreserved spermatozoa." *Theriogenology* 158: 180-187.

Ceusters, J. D., Mouithys-Mickalad, A. A., Franck, T. J., Derochette, S., Vanderplasschen, A., Deby-Dupont, G. P., Serteyn, D. A. (2013). "Effect of myeloperoxidase and anoxia/reoxygenation on mitochondrial respiratory function of cultured primary equine skeletal myoblasts." *Mitochondrion* 13(5): 410-416.

Chadwick, J. W., Fine, N., Khoury, W., Tasevski, N., Sun, C. X., Boroumand, P., Klip, A., Glogauer, M. (2021). "Tissue-specific murine neutrophil activation states in health and inflammation." *Journal of leukocyte biology* 110(1): 187-195.

Chandler, J. D., Day, B. J. (2015). "Biochemical mechanisms and therapeutic potential of pseudohalide thiocyanate in human health." *Free radical research* 49(6): 695-710.

- Chatdarong, K., Kampa, N., Axnér, E., Linde-Forsberg, C. (2002). "Investigation of Cervical Patency and Uterine Appearance in Domestic Cats by Fluoroscopy and Scintigraphy." *Reproduction in Domestic Animals* 37(5): 275-281.
- Christoffersen, M., Baagoe, C. D., Jacobsen, S., Bojesen, A. M., Petersen, M. R., Lehn-Jensen, H. (2010). "Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis." *Veterinary immunology and immunopathology* 138(1): 95-105.
- Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A. M., Jacobsen, S., Petersen, M. R., Troedsson, M. H. T., Lehn-Jensen, H. (2012). "Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis." *BMC Veterinary Research* 8(1): 41.
- Churg, A., Anderson, W. A. (1974). "Induction of Endometrial Peroxidase Synthesis and Secretion by Estrogen and Estrogen Antagonist." *The Journal of cell biology* 62(2): 449-459.
- Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., Paraggio, G., Pasolini, M. P. (2012). "Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares." *Theriogenology* 77(1): 89-98.
- Costa, R. P. R. d., Branco, V., Pessa, P., Silva, J. R., Ferreira-Dias, G. (2005). "Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in equine luteal tissue." *Reproduction fertility and development* 17(6): 659-666.
- Couto, G. B., Vaillancourt, D. H., Lefebvre, R. C. (2013). "Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows." *Theriogenology* 79(1): 103-107.
- Cummings, A. M., Metcalf, J. L. (1994). "Mechanisms of the stimulation of rat uterine peroxidase activity by methoxychlor." *Reproductive Toxicology* 8(6): 477-486.
- Da Silva, E., Martin-Cano, F. E., Gomez-Arrones, V., Gaitskell-Phillips, G., Alonso, J. M., Rey, J., Becerro, L., Gil, M. C., Pena, F. J., Ortega-Ferrusola, C. (2024). "Bacterial endometritis-induced changes in the endometrial proteome in mares: Potential uterine biomarker for bacterial endometritis." *Theriogenology* 226: 202-212.
- Dael, P. F., Ammon, D. C., Stabenfeldt, G. H., Liu, I. K., Hughes, J. P., Lasley, B. L. (1991). "Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares." *Theriogenology* 35(5): 1001-1017.
- Dalen, C., Whitehouse, M. W., Winterbourn, C., Kettle, A. (1997). "Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase." *The Biochemical journal* 327 (Pt 2): 487-492.
- Daspet, S. M., Ponthier, J., Jolly, S., Deleuze, S. (2010). "Cytological diagnosis of endometritis in mares: a comparative study." *Reproduction in Domestic Animals* 45s3: 64.
- Dastur, D. K., Quadros, E. V., Wadia, N. H., Desai, M. M., Bharucha, E. P. (1972). "Effect of Vegetarianism and Smoking on Vitamin B12, Thiocyanate, and Folate Levels in the Blood of Normal Subjects." *British Medical Journal* 3(5821): 260-263.

- Davies, M. J., Hawkins, C. L., Pattison, D. I., Rees, M. D. (2008). "Mammalian heme peroxidases: From molecular mechanisms to health implications." *Antioxidants & redox signaling* 10(7): 1199-1234.
- Davies, M. J., Hawkins, C. L. (2020). "The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease." *Antioxidants & redox signaling* 32(13): 957-981.
- Davis, H. A., Stanton, B., Thungrat, K., Boothe, D. M. (2013). "Uterine bacterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003–2008)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 242(7): 977-983.
- de Araujo, T. H., Okada, S. S., Ghosn, E. E., Taniwaki, N. N., Rodrigues, M. R., de Almeida, S. R., Mortara, R. A., Russo, M., Campa, A., Albuquerque, R. C. (2013). "Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages." *Cellular immunology* 281(1): 27-30.
- DeBois, C. H. W., Manspeaker, J. E. (1986). Endometrial biopsy of the bovine. *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*. D. A. Morrow et W. B. Saunders. Philadelphia, W.B. Saunders: 424-426.
- Deby-Dupont, G., Grülke, S., Caudron, I., Mathy-Hartert, M., Benbarek, H., Deby, C., Lamy, M., Serteyn, D. (1998). "Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radioimmunoassay and first results in septic pathologies." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66(3): 257-271.
- Diel de Amorim, M., Gartley, C. J., Foster, R. A., Hill, A., Scholtz, E. L., Hayes, A., Chenier, T. S. (2016). "Comparison of Clinical Signs, Endometrial Culture, Endometrial Cytology, Uterine Low-Volume Lavage, and Uterine Biopsy and Combinations in the Diagnosis of Equine Endometritis." *Journal of equine veterinary science* 44: 54-61.
- Diel de Amorim, M., Khan, F. A., Chenier, T. S., Scholtz, E. L., Hayes, M. A. (2020). "Analysis of the uterine flush fluid proteome of healthy mares and mares with endometritis or fibrotic endometrial degeneration." *Reproduction, Fertility and Development* 32(6): 572-581.
- Doig, P., Waelchli, R. O. (1993). Endometrial biopsy. *Equine reproduction*. A. O. McKinnon et J. L. Voss. Baltimore, Williams & Wilkins: 225-233.
- Donadeu, F. X., Ginther, O. J. (2002). "Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares." *Reproduction* 124(6): 875-885.
- Dumont, Y., Jean-Pierre, H., Godreuil, S. (2020). "Le microbiote vaginal, déséquilibre et impact/vaginal microbiota, imbalance and impact." *Revue francophone des laboratoires* 2020(527): 55.
- Edwards, S. W., Nurcombe, H. L., Hart, C. A. (1987). "Oxidative inactivation of myeloperoxidase released from human neutrophils." *The Biochemical journal* 245(3): 925-928.

- Elweza, A. E., Ezz, M. A., Acosta, T. J., Talukder, A. K., Shimizu, T., Hayakawa, H., Shimada, M., Imakawa, K., Zaghloul, A. H., Miyamoto, A. (2018). "A proinflammatory response of bovine endometrial epithelial cells to active sperm in vitro." *Molecular reproduction and development* 85(3): 215-226.
- England, G. C. W., Burgess, C. M., Freeman, S. L. (2012). "Perturbed sperm–epithelial interaction in bitches with mating-induced endometritis." *The veterinary journal* (1997) 194(3): 314-318.
- Esteller-Vico, A., Liu, I. K. M., Steffey, E. P., Vaughan, M. E., Brosnan, R. J. (2007). "Effect of vascular degeneration on utero-ovarian blood flow and perfusion in the cyclic mare." *Theriogenology* 68(3): 506-506.
- Evans, G. E., Martínez-Conejero, J. A., Phillipson, G. T. M., Sykes, P. H., Sin, I. L., Lam, E. Y. N., Print, C. G., Horcajadas, J. A., Evans, J. J. (2014). "In the secretory endometria of women, luminal epithelia exhibit gene and protein expressions that differ from those of glandular epithelia." *Fertility and Sterility* 102(1): 307-317.e307.
- Evans, M. J., Hamer, J. M., Gason, L. M., Graham, C. S., Asbury, A. C., Irvine, C. H. G. (1986). "Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment." *Theriogenology* 26(1): 37-50.
- Evans, M. J., Hamer, J. M., Gason, L. M., Irvine, C. H. (1987). "Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares." *Journal of reproduction & fertility Supplement* 35: 327-334.
- Evans, T. J., Constantinescu, G. M., Ganjam, V. K. (2007). Chapter 7 - Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the Mare. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Second Edition). R. S. Youngquist et W. R. Threlfall. Saint Louis, W.B. Saunders: 47-67.
- Ezz, M. A., Marey, M. A., Elweza, A. E., Kawai, T., Heppelmann, M., Pfarrer, C., Balboula, A. Z., Montaser, A., Imakawa, K., Zaabel, S. M., Shimada, M., Miyamoto, A. (2019). "TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro." *PLoS One* 14(4): e0214516.
- Fahey, J. V., Wira, C. R. (2002). "Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture." *The Journal of infectious diseases* 185(11): 1606-1613.
- Fahey, J. V., Rossoll, R. M., Wira, C. R. (2005a). "Sex hormone regulation of anti-bacterial activity in rat uterine secretions and apical release of anti-bacterial factor(s) by uterine epithelial cells in culture." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 93(1): 59-66.
- Fahey, J. V., Schaefer, T. M., Channon, J. Y., Wira, C. R. (2005b). "Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract." *Human reproduction (Oxford)* 20(6): 1439-1446.
- Farley, D. B., Ford, S. P., Rosazza, J. P. N. (1992). "Increase in uterine peroxidase activity in the rat uterus during oestrogen hyperaemia." *Journal of reproduction & fertility* 95(2): 551-558.

- Fiala, S. M., Pimentel, C. A., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., Mattos, R. C. (2007). "Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare." *Theriogenology* 67(3): 556-562.
- Fiala, S. M., Mascarenhas Jobim, M. I., Katila, T., Gregory, R. M., Mattos, R. C. (2008). "Sperm distribution in the oviduct and uterus of mares within two hours after artificial insemination." *Pferdeheilkunde* 24(1): 96-98.
- Franck, T., Grulke, S., Deby-Dupont, G., Deby, C., Duvivier, H., Péters, F., Serteyn, D. (2005). "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific equine neutrophil myeloperoxidase measurement in blood." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 17(5): 412-419.
- Franck, T., Kohnen, S., Deby-Dupont, G., Grulke, S., Deby, C., Serteyn, D. (2006). "A specific method for measurement of equine active myeloperoxidase in biological samples and in vitro tests." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 18(4): 326-334.
- Franck, T., Kohnen, S., Boudjeltia, K. Z., Van Antwerpen, P., Bosseloir, A., Niesten, A., Gach, O., Nys, M., Deby-Dupont, G., Serteyn, D. (2009). "A new easy method for specific measurement of active myeloperoxidase in human biological fluids and tissue extracts." *Talanta* 80(2): 723-729.
- Frayne, J., Stokes, C. R. (1994). "MHC Class II positive cells and T cells in the equine endometrium throughout the oestrous cycle." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41(1): 55-72.
- Freeman, K. P., Roszel, J. F., Slusher, S. H., Castro, M. (1990). "Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions." *Theriogenology* 33(4): 799-808.
- Friedrichs, K., Baldus, S., Klinke, A. (2012). "Fibrosis in Atrial Fibrillation - Role of Reactive Species and MPO." *Frontiers in physiology* 3: 214.
- Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., Bowden, R. A. (2003). "Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96(1): 31-41.
- Fumuso, E., Aguilar, J., Giguère, S., David, O., Wade, J., Rogan, D. (2006). "Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis." *Animal reproduction science* 94(1): 282-285.
- Fumuso, E. A., Aguilar, J., Giguère, S., Rivulgo, M., Wade, J., Rogan, D. (2007). "Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 118(1): 30-39.
- Furtmüller, P. G., Burner, U., Obinger, C. (1998). "Reaction of Myeloperoxidase Compound I with Chloride, Bromide, Iodide, and Thiocyanate." *Biochemistry* 37(51): 17923-17930.
- Galijasevic, S., Abdulhamid, I., Abu-Soud, H. M. (2008a). "Melatonin Is a Potent Inhibitor for Myeloperoxidase." *Biochemistry* 47(8): 2668-2677.

- Galijssevic, S., Abdulhamid, I., Abu-Soud, H. M. (2008b). "Potential role of tryptophan and chloride in the inhibition of human myeloperoxidase." *Free radical biology & medicine* 44(8): 1570-1577.
- Ginther, O. J. (1992). "Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects".
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Utt, M. D., Beg, M. A. (2007). "Luteal blood flow and progesterone production in mares." *Animal reproduction science* 99(1): 213-220.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Weinman, S., Kuby, J. (2001). *Immunologie : le cours de Janis Kuby, avec questions de révision*. Paris, Dunod.
- Goldsby, R. A., Kuby, J., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Weinmann, S. (2003). *Immunologie : le cours de Janis Kuby*. Paris, Dunod.
- Grant-Tschudy, K. S., Wira, C. R. (2004). "Effect of Estradiol on Mouse Uterine Epithelial Cell Transepithelial Resistance (TER)." *American Journal of Reproductive Immunology* 52(4): 252-262.
- Green, P. S., Mendez, A. J., Jacob, J. S., Crowley, J. R., Growdon, W., Hyman, B. T., Heinecke, J. W. (2004). "Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease." *Journal of neurochemistry* 90(3): 724-733.
- Grulke, S., Franck, T., Gangl, M., Péters, F., Salciccia, A., Deby-Dupont, G., Serteyn, D. (2008). "Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease." *The Canadian Journal of Veterinary Research* 72(1): 37-42.
- Haegens, A., Vernooy, J. H. J., Heeringa, P., Mossman, B. T., Wouters, E. F. M. (2008). "Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents." *The European Respiratory Journal* 31(2): 252-260.
- Håkansson, A., Albihn, A., Magnusson, U. (1993). "The contribution of complement to opsonic activity in the uterine secretions of mares free of endometritis." *Theriogenology* 39(3): 601-609.
- Hansen, L. K., Becher, N., Bastholm, S., Glavind, J., Ramsing, M., Kim, C. J., Romero, R., Jensen, J. S., Uldbjerg, N. (2014). "The cervical mucus plug inhibits, but does not block, the passage of ascending bacteria from the vagina during pregnancy." *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 93(1): 102-108.
- Hansen, P. J. (2011). "The Immunology of Early Pregnancy in Farm Animals: Immunology of Early Pregnancy." *Reproduction in domestic animals* 46: 18-30.
- Healy, L. L., Cronin, J. G., Sheldon, I. M. (2015). "Polarized Epithelial Cells Secrete Interleukin 6 Apically in the Bovine Endometrium1." *Biology of reproduction* 92(6): 151.
- Heil, B. A., Thompson, S. K., Kearns, T. A., Davolli, G. M., King, G., Sones, J. L. (2018). "Metagenetic Characterization of the Resident Equine Uterine Microbiome Using Multiple Techniques." *Journal of equine veterinary science* 66: 111.

- Hinrichs, K., Cummings, M. R., Sertich, P. L., Kenney, R. M. (1988). "Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193(1): 72-75.
- Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., Özgen, S., Schoon, D., Schoon, H.-A. (2009a). "Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Reaction patterns in the cycling mare." *Pferdeheilkunde* 25(3): 212-219.
- Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., Schoon, H. A. (2009b). "Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis." *Theriogenology* 71(2): 264-274.
- Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., Schoon, H.-A. (2009c). "The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis." *Animal Reproduction Science* 111(2): 261-278.
- Holyoak, G. R., Premathilake, H. U., Lyman, C. C., Sones, J. L., Gunn, A., Wieneke, X., DeSilva, U. (2022). "The healthy equine uterus harbors a distinct core microbiome plus a rich and diverse microbiome that varies with geographical location." *Scientific reports* 12(1): 14790.
- Houdeau, E., Larauche, M., Monnerie, R., Bueno, L., Fioramonti, J. (2005). "Uterine motor alterations and estrous cycle disturbances associated with colonic inflammation in the rat." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288(3): 630-637.
- Hughes, J. P., Loy, R. G. (1969). "Investigations on the effect of intrauterine inoculations of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare". *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, Houston, Texas, 15: 289-292.
- Hughes, J. P., Stabenfeldt, G. H., Evans, J. W. (1975). "The oestrous cycle of the mare." *Journal of reproduction and fertility Supplement*(23): 161-166.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2010). "Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System." *Science* 327(5963): 291-295.
- Jerke, U., Rolle, S., Purfürst, B., Luft, F. C., Nauseef, W. M., Kettritz, R. (2013). " β 2 Integrin-mediated Cell-Cell Contact Transfers Active Myeloperoxidase from Neutrophils to Endothelial Cells." *The Journal of biological chemistry* 288(18): 12910-12919.
- Kaeoket, K., Persson, E., Dalin, A. M. (2002). "Corrigendum to "The sow endometrium at different stages of the oestrus cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system" [Anim. Reprod. Sci. 65 (2001) 95–114]." *Animal reproduction science* 73(1): 89-107.
- Kainer, R. A. (2011). Internal Reproductive Anatomy. *Equine reproduction*. A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. A. Vaala et D. D. Varner. Oxford, Wiley-Blackwell. 2: 1582 - 1597.
- Kargapolova, Y., Geißen, S., Zheng, R., Baldus, S., Winkels, H., Adam, M. (2021). "The enzymatic and non-enzymatic function of myeloperoxidase (Mpo) in inflammatory communication." *Antioxidants* 10(4): 562.

- Katila, T., Lock, T. F., Hoffmann, W. E., Smith, A. R. (1990). "Lysozyme, alkaline phosphatase and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis." *Theriogenology* 33(3): 723-732.
- Katila, T. (1995). "Onset and Duration of Uterine Inflammatory Response of Mares after Insemination with Fresh Semen." *Biology of Reproduction* 52(monograph_series1): 515-517.
- Katila, T., Sankari, S., Mäkelä, O. (2000). "Transport of sperm in the reproductive tracts of mares." *Journal of reproduction and fertility Supplement* 56: 571-578.
- Katila, T. (2011). Sperm-Uterine Interactions. *Equine reproduction*. A. O. McKinnon, E. L. Squires et W. A. Vaala. Oxford, Wiley-Blackwell. 1: 1092-1098.
- Katila, T. (2012). "The equine cervix." *Pferdeheilkunde* 28: 35-38.
- Katila, T. (2016). "Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis." *Reproductive Biology* 16(3): 189-196.
- Katila, T., Ferreira-Dias, G. (2022). "Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares." *Animals* 12(6): 779.
- Kawai, T., Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nature immunology* 11(5): 373-384.
- Kenney, R. M. (1978). "Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172(3): 241-262.
- Kenney, R. M., Doig, P. A. (1986). *Equine Endometrial Biopsy. Current therapy in theriogenology*. M. DA. Philadelphia, W.B Saunders Company: 723-729.
- Khalilova, I. S., Dickerhof, N., Mocatta, T. J., Bhagra, C. J., McClean, D. R., Obinger, C., Kettle, A. J. (2018). "A myeloperoxidase precursor, pro-myeloperoxidase, is present in human plasma and elevated in cardiovascular disease patients." *PLoS One* 13(3): e0192952.
- Khan, A., Alsahli, M., Rahmani, A. (2018). "Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives." *Medical sciences* 6(2): 33.
- Kiesecker, J. M., Skelly, D. K., Beard, K. H., Preisser, E. (1999). "Behavioral reduction of infection risk." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(16): 9165-9168.
- King, C. C., Jefferson, M. M., Thomas, E. L. (1997). "Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils." *Journal of leukocyte biology* 61(3): 293-302.
- Kiose, K., Schoon, H.-A. (2016). "Periglandular inflammatory cells in the endometrium of the mare - A physiological defence mechanism which impacts on the development of endometrosis?" *Pferdeheilkunde* 32(1): 15-23.
- Klebanoff, S. J. (1967). "Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism." *The Journal of experimental medicine* 126(6): 1063-1078.

- Klebanoff, S. J. (1979). "Effect of estrogens on the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system." *Infection and Immunity* 25(1): 153-156.
- Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." *Journal of Leukocyte Biology* 77(5): 598-625.
- Klinke, A., Nussbaum, C., Kubala, L., Friedrichs, K., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Paust, H.-J., Schröder, C., Benten, D., Lau, D., Szocs, K., Furtmüller, P. G., Heeringa, P., Sydow, K., Duchstein, H.-J., Ehmke, H., Schumacher, U., Meinertz, T., Sperandio, M., Baldus, S. (2011). "Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces." *Blood* 117(4): 1350-1358.
- Knudsen, O. (1964). "Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares." *The Cornell Veterinarian* 54: 415-422.
- Knutti, B., Pycock, J. F., van der Weijden, G. C., Küpfer, U. (2000). "The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding." *Equine veterinary education* 12(5): 267-270.
- Kolm, G., Klein, D., Knapp, E., Watanabe, K., Walter, I. (2006). "Lactoferrin expression in the horse endometrium: Relevance in persisting mating-induced endometritis." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114(1): 159-167.
- Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila, T. (1994). "Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus." *Theriogenology* 41(3): 629-636.
- Kozdrowski, R., Sikora, M., Buczkowska, J., Nowak, M., Raś, A., Dzięcioł, M. (2015). "Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares." *Animal Reproduction Science* 154: 56-62.
- Kunz, G., Beil, D., Deininger, H., Wildt, L., Leyendecker, G. (1996). "The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscopy." *Human reproduction (Oxford)* 11(3): 627-632.
- Kunz, G., Beil, D., Deiniger, H., Einspanier, A., Mall, G., Leyendecker, G. (1997). "The uterine peristaltic pump. Normal and impeded sperm transport within the female genital tract." *Advances in experimental medicine and biology* 424: 267-277.
- Kunz, G., Beil, D., Huppert, P., Leyendecker, G. (2006). "Control and function of uterine peristalsis during the human luteal phase." *Reproductive biomedicine online* 13(4): 528-540.
- La Rocca, G., Di Stefano, A., Eleuteri, E., Anzalone, R., Magno, F., Corrao, S., Loria, T., Martorana, A., Di Gangi, C., Colombo, M., Sansone, F., Patanè, F., Farina, F., Rinaldi, M., Cappello, F., Giannuzzi, P., Zummo, G. (2009). "Oxidative stress induces myeloperoxidase expression in endocardial endothelial cells from patients with chronic heart failure." *Basic research in cardiology* 104(3): 307-320.
- Lagow, E., DeSouza, M. M., Carson, D. D. (1999). "Mammalian reproductive tract mucins." *Human reproduction update* 5(4): 280-292.

- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Tran, T., Mauragis, D., Klapstein, E. (1994). "Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis." *Equine Veterinary Journal* 26(2): 109-113.
- LeBlanc, M. M., Johnson, R. D., Calderwood Mays, M. B., Valderrama, C. (1995). "Lymphatic Clearance of India Ink in Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis1." *Biology of reproduction* 52(monograph_series1): 501-506.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C., Mauragis, D. (1998). "Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy." *Theriogenology* 50(1): 49-54.
- LeBlanc, M. M., Magsig, J., Stromberg, A. J. (2007). "Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares." *Theriogenology* 68(3): 403-412.
- LeBlanc, M. M. (2008). "When to refer an infertile mare to a theriogenologist." *Theriogenology* 70(3): 421-429.
- LeBlanc, M. M., Causey, R. C. (2009). "Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility." *Reproduction in Domestic Animals* 44(s3): 10-22.
- LeBlanc, M. M. (2010). "Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare: Diagnostics and Treatments for Equine Endometritis." *Reproduction in Domestic Animals* 45(s2): 21-27.
- LeBlanc, M. M., McKinnon, A. O. (2011). Breeding the Problem Mare. *Equine reproduction*. A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. A. Vaala et D. D. Varner. Oxford, Wiley-Blackwell. 2: 2620-2642.
- Lection, J., Wagner, B., Byron, M., Miller, A., Rollins, A., Chenier, T., Cheong, S. H., Diel de Amorim, M. (2024). "Inflammatory markers for differentiation of endometritis in the mare." *Equine Veterinary Journal* 56(4): 678-687.
- Lefkowitz, D. L., Gelderman, M. P., Fuhrmann, S. R., Graham, S., Starnes, J. D., Lefkowitz, S. S., Bollen, A., Moguilevsky, N. (1999). "Neutrophilic Myeloperoxidase-Macrophage Interactions Perpetuate Chronic Inflammation Associated with Experimental Arthritis." *Clinical immunology* 91(2): 145-155.
- Lefkowitz, D. L., Roberts, E., Grattendick, K., Schwab, C., Stuart, R., Lincoln, J., Allen, R. C., Moguilevsky, N., Bollen, A., Lefkowitz, S. S. (2000). "The Endothelium and Cytokine Secretion: The Role of Peroxidases as Immunoregulators." *Cellular immunology* 202(1): 23-30.
- Lewis, G. S. (2003). "Role of ovarian progesterone and potential role of prostaglandin F 2 α and prostaglandin E2 in modulating the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes." *Journal of animal science* 81(1): 285-293.
- Macpherson, M. L., Schlafer, D. H. (2015). "Selected topics in reproductive pathology: mare II". *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, Las Vegas, Nevada, 61: 276-296.

- Madill, S., Troedsson, M. H., Alexander, S. L., Shand, N., Santschi, E. M., Irvine, C. H. (2000). "Simultaneous recording of pituitary oxytocin secretion and myometrial activity in oestrous mares exposed to various breeding stimuli." *Journal of reproduction and fertility Supplement*(56): 351-361.
- Makawiti, D. W., Allen, W. E., Kilpatrick, M. J. (1983). "Changes in oestrone sulphate concentrations in peripheral plasma of Pony mares associated with follicular growth, ovulation and early pregnancy." *Journal of reproduction & fertility* 68(2): 481-487.
- Maloney, S.-E., Khan, F. A., Chenier, T. S., Diel de Amorim, M., Anthony Hayes, M., Scholtz, E. L. (2019). "A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus." *Reproduction in Domestic Animals* 54(3): 473-479.
- Marth, C. D., Young, N. D., Glenton, L. Y., Noden, D. M., Browning, G. F., Krekeler, N. (2015). "Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the equine oestrous cycle." *BMC genomics* 16(1): 934-934.
- Marth, C. D., Firestone, S. M., Glenton, L. Y., Browning, G. F., Young, N. D., Krekeler, N. (2016a). "Oestrous cycle-dependent equine uterine immune response to induced infectious endometritis." *Veterinary Research* 47(1): 110.
- Marth, C. D., Young, N. D., Glenton, L. Y., Noden, D. M., Browning, G. F., Krekeler, N. (2016b). "Effect of ovarian hormones on the healthy equine uterus: A global gene expression analysis." *Reproduction fertility and development* 28(11): 1810-1824.
- Marth, C. D., Firestone, S. M., Hanlon, D., Glenton, L. Y., Browning, G. F., Young, N. D., Krekeler, N. (2018). "Innate immune genes in persistent mating-induced endometritis in horses." *Reproduction fertility and development* 30(3): 533-545.
- Martínez-Marcos, P., Carvajal-Serna, M., Lázaro-Gaspar, S., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A., Casao, A. (2019). "Presence of melatonin-catabolizing non-specific enzymes myeloperoxidase and indoleamine 2,3-dioxygenase in the ram reproductive tract." *Reproduction in Domestic Animals* 54(12): 1643-1650.
- Mathy-Hartert, M., Bourgeois, E., Grülke, S., Deby-Dupont, G., Caudron, I., Deby, C., Lamy, M., Serteyn, D. (1998). "Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes." *Canadian Journal of Veterinary Research* 62(2): 127-132.
- Mckinnon, A. O., Squires, E. L., Carnevale, E. M., Harrison, L. A., Frantz, D., McChesney, A. E., Shideler, R. K. (1988). "Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare". *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, New Orleans, Louisiana, 33: 605-622.
- McRae, A. C. (1988). "The blood-uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids." *Journal of reproduction & fertility* 82(2): 857-873.
- Medina-Bastidas, D., Camacho-Arroyo, I., García-Gómez, E. (2022). "Current findings in endometrial microbiome: impact on uterine diseases." *Reproduction* 163(5): R81-R96.

- Mitchell, C. M., Haick, A. A., Nkwopara, E. E., Garcia, R. R., Rendi, M. M., Agnew, K. K., Fredricks, D. N. D. N., Eschenbach, D. D. (2014). "Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in non-pregnant women." *American journal of obstetrics and gynecology* 212(5): 611. e611-619.
- Mitchell, G., Liu, I. K., Perryman, L. E., Stabenfeldt, G. H., Hughes, J. P. (1982). "Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium--a mucosal immune system." *Journal of reproduction & fertility Supplement* 32: 161-168.
- Moguilevsky, N., Garcia-Quintana, L., Jacquet, A., Tournay, C., Fabry, L., Piérard, L., Bollen, A. (1991). "Structural and biological properties of human recombinant myeloperoxidase produced by Chinese hamster ovary cell lines." *European journal of biochemistry* 197(3): 605-614.
- Morris, L. H. A., Allen, W. R. (2002). "Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket." *Equine Veterinary Journal* 34(1): 51-60.
- Morris, L. H. A., McCue, P. M., Aurich, C. (2020). "Equine endometritis: a review of challenges and new approaches." *Reproduction* 160(5): R95-R110.
- Murphy, C. R., Swift, J. G., Mukherjee, T. M., Rogers, A. W. (1981). "Effects of ovarian hormones on cell membranes in the rat uterus - II. Freeze-fracture studies on tight junctions of the lateral plasma membrane of the luminal epithelium." *Cell Biochemistry and Biophysics* 3(1): 57-69.
- Nash, D. M., Sheldon, I. M., Herath, S., Lane, E. A. (2010). "Markers of the uterine innate immune response of the mare." *Animal Reproduction Science* 119(1): 31-39.
- Nauseef, W. M., McCormick, S., Goedken, M. (2000). "Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase." *Redox reports* 5(4): 197-206.
- Nazhat, S. A., Kitahara, G., Kozuka, N., Mido, S., Sadawy, M., Ali, H. E.-S., Osawa, T. (2018). "Associations of periparturient plasma biochemical parameters, endometrial leukocyte esterase and myeloperoxidase, and bacterial detection with clinical and subclinical endometritis in postpartum dairy cows." *Journal of veterinary medical science* 80(2): 302-310.
- Niederkorn, J. Y. (2006). "See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege." *Nature Immunology* 7(4): 354-359.
- Nielsen, J. M. (2005). "Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy." *Theriogenology* 64(3): 510-518.
- Nielsen, J. M., Nielsen, F. H., Petersen, M. R., Dyrehospital, A. (2012). "Diagnosis of equine endometritis—Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility." *Pferdeheilkunde* 28(1): 8-13.
- Nikolakopoulos, E., Watson, E. D. (1999). "Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare." *Theriogenology* 52(3): 413-423.

Nikolakopoulos, E., Kindahl, H., Gilbert, C. L., Goode, J., Watson, E. D. (2000). "Release of oxytocin and prostaglandin F 2 α around teasing, natural service and associated events in the mare." *Animal reproduction science* 63(1): 89-99.

Noyon, C. (2017). "La présence intrigante de la myéloperoxydase dans les cellules épithéliales de la prostate, serait-elle impliquée dans les lésions prostatiques ?" Doctoral thesis, University Libre de Bruxelles.

Okada, H., Nawa, M., Kimura, J. (1985). "In vitro effect of estrogens on the peroxidase activity of human endometrium." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 61(3): 404-407.

Overbeck, W., Witte, T. S., Heuwieser, W. (2011). "Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares." *Theriogenology* 75(7): 1311-1318.

Paccamonti, D., Pycock, J. (2009). Infertility and subfertility in the mare. *Veterinary reproduction and obstetrics*. D. E. Noakes, T. J. Parkinson et G. C. W. England. Edinburgh, Saunders Elsevier.

Palm, F., Walter, I., Budik, S., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Aurich, C. (2008). "Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and COX-2 mRNA in the equine endometrium." *Theriogenology* 70(5): 843-851.

Palmer, E., Driancourt, M. A., Ortavant, R. (1982). "Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrus." *Journal of reproduction and fertility Supplement* 32: 275-282.

Panzani, D., Di Vita, M., Lainé, A.-L., Guillaume, D., Rota, A., Tesi, M., Vannozzi, I., Camillo, F. (2017). "Corpus Luteum Vascularization and Progesterone Production in Autumn and Winter Cycles of the Mare: Relationship Between Ultrasonographic Characteristics of Corpora Lutea and Plasma Progesterone Concentration in the Last Cycles Before Anestrus." *Journal of Equine Veterinary Science* 56: 35-39.

Parrilla Hernández, S., Ponthier, J., Franck, T. Y., Serteyn, D. D., Deleuze, S. C. (2014). "High concentrations of myeloperoxidase in the equine uterus as an indicator of endometritis." *Theriogenology* 81(7): 936-940.

Parrilla Hernández, S., Delahaut, P., Ponthier, J., Deleuze, S. (2016). "Can serum progesterone be used to decide altrenogest supplementation discontinuation in problem pregnancies in mares?". 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), Tours, France: June 26-30th.

Parrilla Hernández, S., Franck, T., Munaut, C., Feyereisen, É., Piret, J., Farnir, F., Reigner, F., Barrière, P., Deleuze, S. (2023). "Characterization of Myeloperoxidase in the Healthy Equine Endometrium." *Animals* 13(3): 375.

Parsons, A., Cone, R., Moench, T. (2002). Uterine uptake of vaginal fluids: implications for microbicides. *Microbicides*. Antwerp, Belgium: 36.

Paumann-Page, M., Obinger, C., Winterbourn, C. C., Furtmüller, P. G. (2024). "Peroxidasin Inhibition by Phloroglucinol and Other Peroxidase Inhibitors." *Antioxidants* 13(1): 23.

Pierro, E., Minici, F., Alesiani, O., Miceli, F., Proto, C., Screpanti, I., Mancuso, S., Lanzone, A. (2001). "Stromal-Epithelial Interactions Modulate Estrogen Responsiveness in Normal Human Endometrium." *Biology of reproduction* 64(3): 831-838.

Ponthier, J., Franck, T., Mottart, E., Serteyn, D., Deleuze, S. (2008). "Equine frozen semen parameters in relation with total myeloperoxidase concentration." *Animal Reproduction Science* 107: 341-342.

Ponthier, J., Franck, T., Detilleux, J., Mottart, E., Serteyn, D., Deleuze, S. (2009). "Association between Myeloperoxidase Concentration in Equine Frozen Semen and Post-Thawing Parameters." *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 45: 811-816.

Ponthier, J., de la Rebière de Pouyade, G., Desvals, M., Spalart, M., Franck, T., Serteyn, D., Deleuze, S. (2010). "Is neutrophil elastase associated with myeloperoxidase concentration and post-thawing parameters in equine frozen semen?" *Animal Reproduction Science* 121(s): 200-202.

Ponthier, J. (2012). "Origine et effet de la myéloperoxydase lors de la congélation du sperme d'étalement" Doctoral thesis, University of Liège.

Ponthier, J., Desvals, M., Franck, T., Rebière, G., Spalart, M., Palmer, E., Serteyn, D., Deleuze, S. (2012). "Myeloperoxidase in Equine Semen: Concentration and Localization during Freezing Processing." *Journal of Equine Veterinary Science* 32: 32-37.

Ponthier, J., Teague, S., Franck, T., Rebière, G., Serteyn, D., Brinsko, S., Love, C., Blanchard, T., Varner, D., Deleuze, S. (2013). "Effect of non-sperm cells removal with single-layer colloidal centrifugation on Myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen." *Theriogenology* 80(9): 1082-1087.

Ponthier, J., Franck, T., Parrilla-Hernandez, S., Niesten, A., De la Rebiere, G., Serteyn, D., Deleuze, S. (2014). "Concentration, activity and biochemical characterization of myeloperoxidase in fresh and post-thaw equine semen and their implication on freezability." *Reproduction in Domestic Animals* 49(2): 285-291.

Poole, R. K., Soffa, D. R., McAnally, B. E., Smith, M. S., Hickman-Brown, K. J., Stockland, E. L. (2023). "Reproductive Microbiomes in Domestic Livestock: Insights Utilizing 16S rRNA Gene Amplicon Community Sequencing." *Animals* 13(3): 485.

Pulli, B., Ali, M., Iwamoto, Y., Zeller, M. W. G., Schob, S., Linnoila, J. J., Chen, J. W. (2015). "Myeloperoxidase–Hepatocyte–Stellate Cell Cross Talk Promotes Hepatocyte Injury and Fibrosis in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis." *Antioxidants & redox signaling* 23(16): 1255-1269.

Purswell, B. J., Ley, W. B., Sriranganathan, N., Bowen, J. M. (1989). "Aerobic and anaerobic bacterial flora in the postpartum mare." *Journal of Equine Veterinary Science* 9(3): 141-144.

Pycock, J. F., Allen, W. E. (1988). "Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis." *The Veterinary Record* 123(8): 193-195.

Pycock, J. F., Allen, W. E. (1990). "Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis." *Equine veterinary journal* 22(6): 422-425.

- Pycock, J. F. (1996). "The relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis, and pregnancy rate in the mare." *Equine practice* 18: 19-22.
- Pycock, J. F. (2009). Chapter 13 - Breeding Management of the Problem Mare. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (Second Edition). J. C. Samper. Saint Louis, W.B. Saunders: 139-164.
- Pycock, J. F. (2011). Treatment of Fluid Accumulation. *Equine reproduction*. A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. A. Vaala et D. D. Varner. Oxford, Wiley-Blackwell. 2: 2655-2664.
- Rahnama, R., Mahmoudi, A. R., Kazemnejad, S., Salehi, M., Ghahiri, A., Soltanghorae, H., Vafaei, S., Rezaei, A., Zarnani, A. H. (2021). "Thyroid peroxidase in human endometrium and placenta: a potential target for anti-TPO antibodies." *Clinical and experimental medicine* 21(1): 79-88.
- Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., Galvão, A., Leitão, A., Vilela, C., Ferreira-Dias, G. (2014). "Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare." *Journal of Reproductive Immunology* 106: 41-49.
- Rebordão, M. R., Amaral, A., Lukasik, K., Szostek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvao, A., Skarzynski, D. J., Ferreira-Dias, G. (2018). "Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium." *Theriogenology* 113: 8-18.
- Rebordão, M. R., Amaral, A., Fernandes, C., Silva, E., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Skarzynski, D. J., Ferreira-dias, G. (2021). "Enzymes present in neutrophil extracellular traps may stimulate the fibrogenic PGF2α pathway in the mare endometrium." *Animals* 11(9): 2615.
- Rehak, N. N., Cecco, S. A., Niemela, J. E., Elin, R. J. (1997). "Thiocyanate in smokers interferes with the Nova magnesium ion-selective electrode." *Clinical chemistry* 43(9): 1595-1600.
- Reilas, T., Katila, T. (2002). "Proteins and enzymes in uterine lavage fluid of postpartum and nonparturient mares." *Reproduction in Domestic Animals* 37(5): 261-268.
- Reilas, T., Rivera del Alamo, M. M., Liepina, E., Yeste, M., Katila, T. (2016). "Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination." *Theriogenology* 85(4): 617-624.
- Ricketts, S. W., Alonso, S. (1991). "The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease." *Equine veterinary journal* 23(3): 189-192.
- Riddle, W. T., LeBlanc, M. M., Stromberg, A. J. (2007). "Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice." *Theriogenology* 68(3): 395-402.
- Rigby, S. L., Barhoumi, R., Delp, M. D., Burghardt, R. C., Colleran, P., Thompson, J. A., Varner, D. D., Blanchard, T. L., Brinsko, S. P., Taylor, T., Wilkerson, M. K. (2001). "Mares with Delayed Uterine Clearance Have an Intrinsic Defect in Myometrial Function." *Biology of reproduction* 65(3): 740-747.

- Rivera del Alamo, M. M., Reilas, T., Kindahl, H., Katila, T. (2008). "Mechanisms behind intrauterine device-induced luteal persistence in mares." *Animal reproduction science* 107(1): 94-106.
- Robertson, S. A., Chin, P.-Y., Femia, J. G., Brown, H. M. (2018). "Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming." *Journal of Reproductive Immunology* 125: 80-88.
- Roumeguère, T., Delree, P., Van Antwerpen, P., Rorive, S., Vanhamme, L., de Ryhove, L. d. I. K., Serteyn, D., Wespes, E., Vanhaeverbeek, M., Boudjeltia, K. Z. (2012). "Intriguing location of myeloperoxidase in the prostate: A preliminary immunohistochemical study." *The Prostate* 72(5): 507-513.
- Roumeguère, T., Noyon, C., Van Antwerpen, P., Poelvoorde, P., Bar, I., Abdulsater, F., Rousseau, A., Delporte, C., Vanhamme, L., Vanhaeverbeek, M., Delree, P., Boudjeltia, K. Z. (2023). "Role of Myeloperoxidase in ROS Generation and Inflammation Response on Prostate Epithelial Cells." *Inflammation* 46(5): 1859-1870.
- Rozeboom, K., Troedsson, M., Crabo, B. (1998). "Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination." *Journal of reproduction and fertility* 114: 195-199.
- Rudolph, N., Schoon, H.-A., SchöNiger, S. (2017). "Immunohistochemical characterisation of immune cells in fixed equine endometrial tissue: A diagnostic relevant method." *Pferdeheilkunde* 33(6): 524-537.
- Rudolph, V., Andrié, R. P., Rudolph, T. K., Friedrichs, K., Klinke, A., Hirsch-Hoffmann, B., Schwoerer, A. P., Lau, D., Fu, X., Klingel, K., Sydow, K., Didié, M., Seniuk, A., von Leitner, E. C., Szoecs, K., Schrickel, J. W., Treede, H., Wenzel, U., Lewalter, T., Nickenig, G., Zimmermann, W. H., Meinertz, T., Böger, R. H., Reichenspurner, H., Freeman, B. A., Eschenhagen, T., Ehmke, H., Hazen, S. L., Willems, S., Baldus, S. (2010). "Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation." *Nature medicine* 16(4): 470-474.
- Saed, G. M., Ali-Fehmi, R., Jiang, Z. L., Fletcher, N. M., Diamond, M. P., Abu-Soud, H. M., Munkarah, A. R. (2010). "Myeloperoxidase serves as a redox switch that regulates apoptosis in epithelial ovarian cancer." *Gynecologic Oncology* 116(2): 276-281.
- Salciccia, A., Grulke, S., de la Rebière de Pouyade, G., Franck, T., Detilleux, J., Serteyn, D., Sandersen, C. (2016). "Assessment of systemic inflammation by time-trends of blood granulocyte count and plasma myeloperoxidase and elastase concentrations following colic surgery in horses." *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 26(4): 541-548.
- Samper, J. (2007). "How to interpret endometrial edema in brood mares". Proceedings American Association of Equine Practitioners, Orlando, 53: 571-572.
- Samper, J. C. (2009). Chapter 12 - Uterine Edema in the Mare. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (Second Edition). J. C. Samper. Saint Louis, W.B. Saunders: 133-138.
- Schafer, J. F. (1971). "Tolerance to Plant Disease." *Annual Review of Phytopathology* 9(1): 235-252.

- Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., Korting, H. C. (2005). "Human defensins." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83(8): 587-595.
- Schöniger, S., Gräfe, H., Schoon, H.-A. (2013). "Beta-defensin is a component of the endometrial immune defence in the mare." *Pferdeheilkunde* 29(3): 335-346.
- Schöniger, S., Böttcher, D., Theuß, T., Gräfe, H., Schoon, H. A. (2016). "New insights into the innate immune defences of the equine endometrium: in situ and in vitro expression pattern of beta-defensin." *Pferdeheilkunde* 32(1): 4-14.
- Schöniger, S., Böttcher, D., Theuß, T., Schoon, H.-A. (2017). "Expression of Toll-like receptors 2, 4 and 6 in equine endometrial epithelial cells: A comparative in situ and in vitro study." *Research in veterinary science* 112: 34-41.
- Schöniger, S., Gräfe, H., Richter, F., Schoon, H.-A. (2018). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as transcript and protein in the healthy and diseased equine endometrium." *Research in veterinary science* 118: 278-287.
- Schöniger, S., Schoon, H. A. (2020). "The Healthy and Diseased Equine Endometrium: A Review of Morphological Features and Molecular Analyses." *Animals* 10(4): 625.
- Schoon, H. A., Schoon, D., Klug, E. (1992). "Endometrial biopsies as an ancillary aid in diagnosis and prognosis of subfertility in the mare." *Pferdeheilkunde* 8(6): 355-362.
- Schultz, J., Kaminker, K. (1962). "Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 96(3): 465-467.
- Seals, R. C., Wulster-Radcliffe, M. C., Lewis, G. S. (2002). "Modulation of the Uterine Response to Infectious Bacteria in Postpartum Ewes." *American Journal of Reproductive Immunology* 47(1): 57-63.
- Senger, P. L. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition*. Redmond, Current conceptions.
- Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G. (2003). "La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes." *Annales de médecine vétérinaire* 147(2): 79-93.
- Sheldon, I. M., Owens, S.-E., Turner, M. L. (2016). "Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract." *Journal of reproductive immunology* 119: 67-73.
- Sheldon, I. M., Molinari, P. C. C., Ormsby, T. J. R., Bromfield, J. J. (2020). "Preventing postpartum uterine disease in dairy cattle depends on avoiding, tolerating and resisting pathogenic bacteria." *Theriogenology* 150: 158-165.
- Shibata, T., Sakamoto, J., Osaka, Y., Neyatani, N., Fujita, S., Oka, Y., Takagi, H., Mori, H., Fujita, H., Tanaka, Y., Sasagawa, T. (2017). "Myeloperoxidase in blood neutrophils during normal and abnormal menstrual cycles in women of reproductive age." *International journal of laboratory hematology* 39(2): 169-174.

- Silva, L. D. M., Onclin, K., Verstegen, J. P. (1995). "Cervical opening in relation to progesterone and oestradiol during heat in beagle bitches." *Journal of reproduction & fertility* 104(1): 85-90.
- Siraki, A. G. (2021). "The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery." *Redox biology* 46: 102109.
- Snoeck, V., Peters, I. R., Cox, E. (2006). "The IgA system: A comparison of structure and function in different species." *Veterinary research (Paris)* 37(3): 455-467.
- Storms, N., Medina Torres, C., Franck, T., Sole Guitart, A., de la Rebière, G., Serteyn, D. (2022). "Presence of Myeloperoxidase in Lamellar Tissue of Horses Induced by an Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp." *Frontiers in Veterinary Science* 9: 846835.
- Strzemienski, P. J., Do, D., Kenney, R. M. (1984). "Antibacterial activity of mare uterine fluid." *Biology of reproduction* 31(2): 303-311.
- Summerfield, N. J., Watson, E. D. (1998). "Endometrial macrophage populations in genetically normal mares at oestrus and dioestrus and in mares susceptible to endometritis." *Equine Veterinary Journal* 30(1): 79-81.
- Taverne, M. A., van der Weyden, G. C., Fontijne, P., Dieleman, S. J., Pashen, R. L., Allen, W. R. (1979). "In-vivo myometrial electrical activity in the cyclic mare." *Journal of reproduction & fertility* 56(2): 521-532.
- Teixeira-Soares, C. M., Viana, A. G., Carvalho, R. P. R., Barros, E., Ramirez-Lopez, C., Moura, A. A., Machado-Neves, M. (2025). "Unraveling the uterine fluid proteome of mares diagnosed with post-breeding and infectious endometritis." *Journal of Reproductive Immunology* 167: 104401.
- Traub-Dargatz, J. L., Salman, M. D., Voss, J. L. (1991). "Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198(10): 1745-1747.
- Troedsson, M. H., Liu, I. (1991). "Uterine clearance of non-antigenic markers (^{51}Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections." *Journal of reproduction and fertility Supplement* 44: 283-288.
- Troedsson, M. H., Liu, I. K., Ing, M., Pascoe, J., Thurmond, M. (1993a). "Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection." *Journal of reproduction and fertility* 99(2): 307-313.
- Troedsson, M. H., Liu, I. K. M., Thurmond, M. (1993b). "Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus Zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection." *Biology of Reproduction* 49(3): 502-506.
- Troedsson, M. H., Steiger, B. N., Ibrahim, N. M., Foster, D., Crabo, B. (1995). "Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare." *Biology of reproduction* 52.

- Troedsson, M. H. (1997). "Therapeutic considerations for mating-induced endometritis." *Pferdeheilkunde* 13: 516-520.
- Troedsson, M. H., Liu, I. K., Crabo, B. G. (1998). "Sperm transport and survival in the mare: a review." *Theriogenology* 50(5): 807-818.
- Troedsson, M. H. (1999). "Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare." *Theriogenology* 52(3): 461-471.
- Troedsson, M. H. (2006). "Breeding-Induced Endometritis in Mares." *The Veterinary clinics of North America Equine practice* 22(3): 705-712.
- Troedsson, M. H. (2011). *Endometritis. Equine reproduction.* A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. A. Vaala et D. D. Varner. Oxford, Wiley-Blackwell. 2: 2608-2619.
- Trotter, G. W., McKinnon, A. O. (1988). "Surgery for abnormal vulvar and perineal conformation in the mare." *The Veterinary clinics of North America Equine practice* 4(3): 389-405.
- Tunón, A. M., Rodriguez-Martinez, H., Haglund, A., Albihn, A., Magnusson, U., Einarsson, S. (1995). "Ultrastructure of the secretory endometrium during oestrus in young maiden and foaled mares." *Equine veterinary journal* 27(5): 382-388.
- Tuppits, U., Orro, T., Einarsson, S., Kask, K., Kavak, A. (2014). "Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares." *Animal Reproduction Science* 146(3): 182-186.
- Van Camp, S. D. (1988). "Endometrial biopsy of the mare. A review and update." *The Veterinary clinics of North America Equine practice* 4(2): 229-245.
- Van Der Veen, B. S., De Winther, M. P. J., Heeringa, P. (2009). "Myeloperoxidase: Molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease." *Antioxidants & redox signaling* 11(11): 2899-2937.
- Vanderwall, D. K. (2008). "Early Embryonic Loss in the Mare." *Journal of equine veterinary science* 28(11): 691-702.
- Waelchli, R. O., Winder, N. C. (1991). "Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: immunohistochemical studies." *Equine veterinary journal* 23(6): 470-474.
- Walmer, D. K., Wrona, M. A., Hughes, C. L., Nelson, K. G. (1992). "Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone." *Endocrinology* 131(3): 1458-1466.
- Watson, E. D., Stokes, C. R., Bourne, F. J. (1987a). "Influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovariectomized mares." *Journal of Endocrinology* 112(3): 443-448.
- Watson, E. D., Stokes, C. R., Bourne, F. J. (1987b). "Influence of arachidonic acid metabolites in vitro and in uterine washings on migration of equine neutrophils under agarose." *Research in Veterinary Science* 43(2): 203-207.

- Watson, E. D., Stokes, C. R., David, J. S., Bourne, F. J. (1987c). "Effect of ovarian hormones on promotion of bactericidal activity by uterine secretions of ovarioectomized mares." *Journal of reproduction and fertility* 79(2): 531-537.
- Watson, E. D., Dixon, C. E. (1993). "An immunohistological study of MHC Class II expression and T lymphocytes in the endometrium of the mare." *Equine Veterinary Journal* 25(2): 120-124.
- Watson, E. D., Thomson, S. R. M. (1996). "Lymphocyte subsets in the endometrium of genetically normal mares and mares susceptible to endometritis." *Equine veterinary journal* 28(2): 106-110.
- Watson, E. D. (2000). "Post-breeding endometritis in the mare." *Animal Reproduction Science* 60-61: 221-232.
- Wauters, J., Pille, F., Martens, A., Franck, T., Serteyn, D., Gasthuys, F., Meyer, E. (2013). "Equine myeloperoxidase: a novel biomarker in synovial fluid for the diagnosis of infection." *Equine veterinary journal* 45(3): 278-283.
- Widders, P. R., Stokes, C. R., David, J. S., Bourne, F. J. (1984). "Quantitation of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare." *Research in veterinary science* 37(3): 324-330.
- Widders, P. R., Stokes, C. R., David, J. S., Bourne, F. J. (1985). "Specific antibody in the equine genital tract following systemic and local immunization." *Immunology* 54(4): 763-769.
- Williamson, P., Dunning, A., O'Connor, J., Penhale, W. J. (1983). "Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis." *Theriogenology* 19(3): 441-448.
- Wira, C. R., Fahey, J. V. (2004). "The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract." *Immunology* 111(1): 13-15.
- Wira, C. R., Fahey, J. V., Sentman, C. L., Pioli, P. A., Shen, L. (2005a). "Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions." *Immunological reviews* 206(1): 306-335.
- Wira, C. R., Grant-Tschudy, K. S., Crane-Godreau, M. A. (2005b). "Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection." *American journal of reproductive immunology* (1989) 53(2): 65-76.
- Wira, C. R., Rodriguez-Garcia, M., Patel, M. V. (2015). "The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract." *Nature reviews Immunology* 15(4): 217-230.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). "Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects." *Laboratory Investigation* 80(5): 617-653.
- Wojtysiak, K., Ryszka, W., Stefaniak, T., Król, J., Kozdrowski, R. (2020). "Changes in the Secretion of Anti-Inflammatory Cytokines and Acute-Phase Proteins in the Uterus after Artificial Insemination in the Mare." *Animals* 10(12).

Woods, G. L., Baker, C. B., Baldwin, J. L., Ball, B. A., Bilinski, J., Cooper, W. L., Ley, W. B., Mank, E. C., Erb, H. N. (1987). "Early pregnancy loss in brood mares." *Journal of reproduction and fertility* 35: 455-459.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Squires, E. L., Troedsson, M. H. T. (2012). "Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons." *Theriogenology* 78(3): 495-501.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., Squires, E. L., Troedsson, M. H. T. (2013a). "Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis." *Reproduction* 145(3): 289-296.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Horohov, D. W., Scoggin, K. E., Squires, E., Troedsson, M. H. T. (2013b). "An Investigation of Uterine Nitric Oxide Production in Mares Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-Induced Endometritis and the Effects of Immunomodulation." *Reproduction in Domestic Animals* 48(4): 554-561.

Wray, S. (1993). "Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation." *The American journal of physiology* 264(1 Pt 1): C1-18.

Yang, J. J., Preston, G. A., Pendergraft, W. F., Segelmark, M., Heeringa, P., Hogan, S. L., Jennette, J. C., Falk, R. J. (2001). "Internalization of Proteinase 3 Is Concomitant with Endothelial Cell Apoptosis and Internalization of Myeloperoxidase with Generation of Intracellular Oxidants." *The American journal of pathology* 158(2): 581-592.

Yang, Z., Xiao, K., Wang, W., Tang, J., Sun, P.-P., Peng, K.-M., Song, H. (2015). "The Effect of Visfatin on Inflammatory Reaction in Uterus of LPS-Induced Rats." *International journal of morphology* 33(1): 194-203.

Zerbe, H., Schuberth, H. J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E., Leibold, W. (2003). "Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares." *Theriogenology* 60(2): 209-223.

Zervomanolakis, I., Ott, H. W., Hadzimerovic, D., Mattle, V., Seeber, B. E., Virgolini, I., Heute, D., Kissler, S., Leyendecker, G., Wildt, L. (2007). "Physiology of Upward Transport in the Human Female Genital Tract." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1101(1): 1-20.

Zhang, Z., Guo, Y., Liu, Y., Li, C., Guo, M., Deng, G. (2017). "IFN- τ Displays Anti-Inflammatory Effects on *Staphylococcus aureus* Endometritis via Inhibiting the Activation of the NF- B and MAPK Pathways in Mice." *BioMed Research International* 2017: 1-12.

Annexes :

Publications scientifiques

Theriogenology 81 (2014) 936–940



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology
journal homepage: www.theriojournal.com



High concentrations of myeloperoxidase in the equine uterus as an indicator of endometritis

Sonia Parrilla-Hernandez ^{a,c,*}, Jérôme Ponthier ^{a,c}, Thierry Y. Franck ^b, Didier D. Serteyn ^{b,c}, Stéfan C. Deleuze ^{a,c}

^aEquine Clinic, Veterinary Medicine Faculty, University of Liège, Liège, Belgium

^bCentre for Oxygen Research and development (CORD), University of Liège, Liège, Belgium

^cCentre Européen du Cheval, Linalux-MLS, Vielsalm, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2013

Received in revised form 23 January 2014

Accepted 24 January 2014

Keywords:

Mare
Endometritis
Myeloperoxidase
Intraluminal fluid
Hyperedema
Cytology

ABSTRACT

Intraluminal fluid and excessive abnormal hyperedema are regularly used for the diagnosis of endometritis in the mare, which is routinely confirmed by the presence of neutrophils on endometrial smears. Studies show a relation between neutrophils and myeloperoxidase (MPO), an enzyme contained in and released by neutrophils during degranulation or after cell lysis. This enzyme has been found in many fluids and tissues, and associated with different inflammatory pathologies in the horse. The aims of this study were to assess the presence and concentration of MPO in the equine uterus, and to investigate its relation with neutrophils, and other clinical signs of endometritis. Mares (n = 51) were evaluated for the presence of intraluminal fluid and excessive endometrial edema before breeding, and a small volume lavage and cytology samples were obtained. From 69 cycles, supernatant of the uterine flushes was analyzed with a specific equine MPO ELISA assay to measure MPO concentration. Cytology samples were used for the diagnosis of endometritis. Myeloperoxidase was present in the uterus of all estrus mares in highly variable concentrations. Myeloperoxidase concentrations were significantly ($P < 0.05$) higher in samples with positive cytologies and in the presence of intraluminal fluid. Occasionally, some samples with negative cytologies showed high MPO concentration, but the opposite was never observed. Cycles presenting hyperedema weren't associated with high concentration of MPO, intraluminal fluid, or positive cytology, making it a poor diagnostic tool of endometritis.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Breeding mares results in a transient physiological inflammation of the endometrium [1–3]. This occurs as a response to semen, seminal plasma, extender, and/or bacteria present within the uterine lumen, but other factors including anatomical abnormalities and uterine degeneration can also contribute to its development [4]. Failure of this inflammation to resolve majorly affects the mare's fertility [1,5–8].

Activation of various inflammatory mediators increases vascular permeability, induces the influx of serum proteins

and immunoglobulins (Ig) into the uterine lumen [9,10], and migration of polymorphonuclear neutrophils [9–12]. Clinical signs such as intraluminal fluid [4,13] and to a lesser extent, the presence of an abnormal quantity in edema of the endometrial folds, so called hyperedema [7,14], are used as practical tools to diagnose the pathology. The presence of inflammatory cells, mainly neutrophils within the endometrial lumen or wall can be used as a marker of endometritis [10,11,15,16]. Uterine cytology and biopsy are commonly performed to confirm a suspicion of the condition [17], whereas uterine culture may identify the eventual bacteria involved.

A better understanding of the mechanisms and processes involved in this pathology is necessary to improve the management of susceptible mares, and increase their pregnancy

* Corresponding author. Tel.: +32 80216556; fax: +32 80672356.
E-mail address: sphvet@gmail.com (S. Parrilla-Hernandez).

rate. Various inflammatory markers of the uterine environment have already been investigated [18–20]. In the horse, myeloperoxidase (MPO) has been found in many fluids and tissues, and associated with different inflammatory pathologies [21,22]. Myeloperoxidase is a prooxidant enzyme contained in and released by neutrophils during degranulation or after cell lysis [23,24]. In the field of equine reproduction, MPO has been mainly studied in sperm [25–28], but to our knowledge, presence of the enzyme and its significance in the uterus of the mare has not been investigated yet.

The objective of this study was to assess the presence of MPO in equine uterine lumen during estrus, to measure its concentrations, and to determine its relation with endometritis and its associated clinical signs.

2. Materials and methods

2.1. Mares and samples collection

The study was performed on mares presented for insemination with fresh or frozen semen, at Linalux-MLS Equine Reproduction Center between April 2011 and January 2013, without interfering with the normal monitoring and insemination procedure. All samples were obtained before breeding during a complete routine reproductive examination. A total of 51 Warmblood, Arabian, Lusitanian, Quarter Horse, and Draft Horse mares, aged from 5 to 23 years (mean: 13.4) were included, and 69 cycles were exploited. Pregnancy diagnosis was routinely performed at Day 14 with ultrasonography.

Mares were regularly scanned until a follicle greater than 35 mm was observed, when all samples and data were collected. Swabs and uterine lavages were obtained from all mares. After a vulvar scrub, a uterine cotton swab (Equivet; Kruuse, Marselv, Denmark) or a double-guarded uterine Cytology Brush (Minitüb, Tiefenbach, Germany) was passed per vagina into the uterus, and an endometrial cytology sample was obtained. Cytologic slides were air dried and stained with Diff-Quick (RAL, Martillac, France).

Using a sterile double-sleeve technique and a sterile insemination pipette (Minitüb), a low-volume (60 mL) uterine lavage was performed with Ringer's lactate. After a uterus massage the fluid was reaspirated into EDTA and/or dry tubes, and samples were centrifuged at 600×g for 10 minutes immediately. For technical reasons, some samples were collected in EDTA (n = 26) and some others (n = 38) in dry tubes. To validate the assay for both tubes, five samples were collected in EDTA and dry tubes. Supernatants were collected in 2 mL tubes, and stored at -20 °C until MPO analysis. Pellets were smeared on a glass slide, air dried and stained with Diff-Quick for cytologic examination.

2.2. Intraluminal fluid and edema grade

The quantity of intraluminal fluid was measured using ultrasonography. More than 1 cm of liquid was scored as abnormal for statistical analysis.

Edema was graded with a subjective scoring system slightly modified from a previous description [29]. Grade 0 was scored in the absence of edema; grade I when uterine folds were difficult to identify; grade II when some of the

endometrial folds could be identified and the cervix had a fish-bone appearance; grade III when endometrial folds were easily identified with hyperechoic borders and hypoechoic centers (cartwheel); and grade IV for mares with "hyperedema", where endometrial folds were abnormally thick, and the normal architecture of the cartwheel was lost.

2.3. Cytology

A minimum of 10 fields were evaluated microscopically (400×) by the same examiner. The number of neutrophils per field was used to evaluate the degree of inflammation. For statistical analysis, an average of one or more neutrophil per field at 400× magnification was considered a sign of inflammation as previously described [7,30].

2.4. Myeloperoxidase analysis

Concentration of MPO was determined by a commercial ELISA (Bioptris SA, Liège, Belgium) developed by Frank, et al. [24]. The primary antibody, rabbit IgG against MPO, was coated onto microplate wells (Cliniplate EB; Thermo Lab-systems, Helsinki, Finland). Equine MPO standard (0, 1.015, 2.03, 4.06, 8.12, 16.25, 32.5, and 65 ng/mL) and low-volume uterine flush supernatants diluted 50× and 200× were added (100 µL) into the wells, and microplates were incubated overnight at 4 °C. After the plates were washed with 0.9% NaCl solution containing 0.1% Tween 20 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) the immobilized antibody-antigen complexes were incubated for 2 hours at 37 °C with the secondary antibody, guinea pig IgG against equine MPO labeled with alkaline phosphatase. After another washing, phosphatase activity was determined by incubation for 30 minutes at 37 °C in the dark with a paranitrophenyl phosphate stabilized solution. The reaction was stopped with 2.5 M NaOH and the absorbance at 405 nm read with the Multiscan Ascent Plate Reader (Thermo Labsystems). The absorbance was directly proportional to the activity of alkaline phosphatase bound to the secondary antibody against MPO and thus to the concentration of MPO immunocaptured from the sample. Each sample was assayed at two dilutions (50× and 200×), and when a concentration of MPO was obtained at both dilutions, the mean was calculated and taken into consideration. The mean value of coefficient of variation (CV) intraassays was 14.92 ± 13.15%, and 74% of the samples have CV lower than 14.92%. The CV greater than 20% corresponds to samples situated at the lower and upper limit of detection of the calibration curve. Despite a double dilution (50× and 200×) to obtain values for low and high concentration samples, some remained out of calibration curve, and they were marked as higher than 7000 ng/mL (i.e., the upper limit of detection).

2.5. Statistical analysis

For discontinuous data such as the presence of uterine liquid, hyperedema, pregnancy, and cytology, Fisher's test was used to determine the significance of contingency table. Normal distribution of parameters was tested with Kolmogorov-Smirnov test. As values were non-normally

distributed, results are expressed in medians. The MPO medians were compared between groups with Mann-Whitney test. For the comparison of results on EDTA with dry tubes, a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test, which is a nonparametric test was used. Statistical significance was established at P-value less than 0.05.

3. Results

3.1. Hyperedema, intraluminal fluid, and cytology

A total of 69 cycles were studied. Distribution of cytology results, presence of edema and intraluminal fluid for these cycles is summarized in Table 1.

A strongly significant association between the presence of free fluid and the cytology result ($P = 0.0003$) was observed. No other statistical relation was found between the other parameters.

3.2. Myeloperoxidase concentration

When comparing the MPO concentrations from samples collected in EDTA with dry tubes ($n = 5$ for each method), there was no significant difference in MPO concentration detected ($P = 0.4375$). Therefore, the results of the study with samples collected in EDTA ($n = 26$) and dry tubes ($n = 38$) were combined for data analysis. Myeloperoxidase was detected in all uterine flushes. The concentration of the enzyme varied between cycles, with values ranging from 10.06 to greater than 7000 ng/mL, the upper detection limit of the assay. The overall median concentration of MPO was 1617.860 ng/mL. Results of MPO (median) concentration in relation with the different parameters studied are given in Table 2.

Generally, mares with endometritis had higher MPO concentrations in uterine supernatants ($P = 0.0087$) than those from mares with negative cytology. Occasionally, some negative cytology results were associated with a high concentration of MPO, but the contrary (small quantities of MPO in uterine fluids from mares with an endometritis) was not observed.

Significantly higher concentrations of MPO were observed in mares presenting an abnormal accumulation of free fluid ($P = 0.0367$). Of 10 cycles, where more than 1 cm of fluid was observed, only one was associated with a low MPO concentration. However, samples considered free of liquid had variable MPO concentrations.

MPO concentrations in the uterine flush of mares presenting a hyperedema during estrus were highly variable, but showed no statistical difference compared with mares

Table 1
Distribution of cytology results, presence of edema, and intraluminal fluid for the studied cycles.

| | Cytology+ | Cytology- | Fluid+ | Fluid- |
|--------------|-----------|-----------|---------|----------|
| Hyperedema | 2 (3%) | 19 (28%) | 3 (4%) | 18 (26%) |
| Normal edema | 6 (9%) | 42 (61%) | 7 (10%) | 41 (59%) |
| Fluid+ | 6 (9%) | 4 (6%) | | |
| Fluid- | 4 (6%) | 55 (80%) | | |

Table 2
Myeloperoxidase median concentrations (ng/mL) in uterine lavage according to the clinical parameters studied.

| | Positive | Negative |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Cytology | 7000 ^a (899.335->7000) | 1128.7 ^b (10.060->7000) |
| Hyperedema | 1121.9 (10.060->7000) | 1617.9 (13.93->7000) |
| Uterine-free fluid | 7000 ^c (50.815->7000) | 1436.8 ^d (10.060->7000) |
| Pregnancy | 1099.6 (21.055->7000) | 2552.3 (13.93->7000) |

Different superscripts within lines indicate statistical difference ($P < 0.05$).

with a normal degree of edema, from grade I to III ($P = 0.6382$).

3.3. Pregnancy

No association between pregnancy diagnosis and either the presence of fluid, hyperedema, or positive cytology results was observed. Although, nonpregnant cycles (54.2%) presented higher levels of MPO concentration, no statistical difference was observed ($P = 0.0917$).

4. Discussion

Ultrasonographic detection of intraluminal fluid has been reported to be an accurate indicator of endometritis [13,31], which is supported by the association between fluid and the presence of inflammatory cells in the present study. Intraluminal fluid observation is routinely used in practice as a tool to diagnose endometritis [32]. However, the diagnosis cannot solely rely on the presence of this clinical sign, as some mares will show intraluminal fluid without the presence of inflammation [4,33]. Similarly, the presence of excessive endometrial edema postbreeding has been considered as a clinical sign of endometrial inflammation [7,14].

An increase of the uterine blood perfusion occurs in mares under the influence of estrogens, resulting in an increase of endometrial edema. In most cases, appearance and disappearance of estrus-associated endometrial edema is progressive [34,35], but a percentage of mares present a grade of edema without concordance with the moment of the cycle or estrogen plasma concentration [14,29]. Hyperedema is characterized by visualization of thickened and prominent endometrial folds that have a hyperechoic border and marked hypoechoogenicity at the center [14]. Excessive edema has been described as an indicative of uterine pathology when present during the normal estrus period [29], and associated positive cytologies have been found in 56.9% of cases in a study [14]. The study considered mares as having excessive edema either when it was observed at the time of breeding, or when normal edema had failed to regress 48 hours after breeding. Positive cytologies in that study were thus related to postmaturing endometritis. In our study, only 3% of mares presenting hyperedema were found positive for cytology, and no association was shown between those parameters. Part of this discrepancy may be attributed to false negative results for cytology [7,17,36]. However, because data on cytology and degree of edema were obtained, when a follicle of 35 mm was present (i.e., before breeding), our results suggest that hyperedema in early estrus is not related to

endometritis. Although preexisting endometritis explaining hyperedema before breeding should be considered, noninflammatory causes may account for hyperedema. An impaired uterine drainage because of cervical incompetence [37], excessive vascular response to estrogens, a lymphatic pathology or an altered myoelectrical activity [7,12], may also be responsible for this excessive edema.

One study has associated endometrial hyperedema and the presence of uterine fluid [14]. However, this was not observed in our experiment, and has not been confirmed by further similar reports in the literature. It may be hypothesized that observation of intraluminal fluid in the presence of excessive edema depends on the severity of drainage deficiency inducing the latter.

Results of samples collected on EDTA and dry tubes were considered indifferently, as MPO concentration of divided samples showed no significant difference. Although EDTA has been described as the best condition to maintain stable MPO concentration in blood samples by preventing blood coagulation leading to the stimulation of neutrophils, subsequent degranulation, and partial destruction [38], it can be assumed that the very nature of our samples (uterine flush vs. blood), and immediate centrifugation in our experiment prevented significant further neutrophils degranulation and alteration of measured MPO concentrations.

Myeloperoxidase was detected in uterine flushes from all estrus mares suggesting a physiological MPO presence during this phase of the cycle. To our knowledge, this is the first report about the presence of free MPO in the uterine lumen of mares. Myeloperoxidase concentrations observed in the equine uterus are highly variable. Minimal values were lower than plasma concentrations of healthy horses (169.7 ng/mL) [21], and maximal values were higher than bronchoalveolar lavage content of pathologic horses (500 ng/mL) [21] and plasma concentrations from horses with large intestine strangulated pathology (1169.46 ng/mL) [22]. Myeloperoxidase in equine frozen semen has been reported to be quite high (19050 ng/mL) [26], however, as no further dilution was performed to obtain a definite value, and high concentrations were recorded as above 7000 ng/mL, MPO in the uterine lumen in our study cannot be compared with those results.

Mares with a positive cytology had a significantly higher MPO concentration. This relation is not surprising as MPO, being contained in and release by neutrophils [23], is involved in the inflammatory reaction. Some individual mares that were negative for cytology also showed high concentrations of MPO. False negative results are mainly associated with the use of cotton swabs [39,40], and may explain these cases. Some pathogens seem to induce a limited acute neutrophilic response [36], and in chronic endometritis, neutrophils are present in deeper layers of the endometrium explaining negative swabs. A similar approach with uterine biopsies, which are accepted as a "gold standard" [17] for the diagnosis of endometritis, should be used to alleviate this limitation.

Alternatively, these levels of MPO might be the remaining trace of previous endometrial inflammation as a recent article has suggested a potential delayed release of MPO by noninflammatory cells after capture [41,42].

As already described, presence of intraluminal fluid is a tool for the diagnosis of endometritis [32]. A statistically significant ($P = 0.0367$) relation between fluid accumulation and MPO concentration was observed, confirming that both are markers of endometrial inflammation. Conversely, hyperedema was not related to positive cytology, intraluminal fluid, or MPO concentration in our study, suggesting it should not be considered as an indicator of endometritis. The relation between pathologic uterine condition and MPO concentration needs to be further studied to establish a threshold between physiological and pathologic MPO concentrations in uterine flushes.

Pregnancy diagnosis was not affected by any of the studied parameters. All mares of the study were part of a commercial breeding program, and benefited from intense management and treatments, possibly improving pregnancy rate despite uterine condition.

4.1. Conclusions

As a conclusion, this is the first report of MPO presence within the uterine lumen in the mare. Myeloperoxidase was observed in all estrus mares, suggesting a physiological role during that phase of the cycle. Presence of MPO during diestrus and anestrus still needs to be investigated.

High concentrations of MPO and intraluminal fluid accumulation indicate endometrial inflammation, but excessive edema does not. Hyperedema should only be seen as a marker of an underlying disorder interfering with edema resorption (e.g., decreased lymphatic drainage), potentially contributing to the further development of endometritis. Further work to establish the threshold between physiological and pathologic uterine concentrations of MPO in the mare is still needed to make it a practical tool in breeding management.

Acknowledgments

This research was made possible by the financial support of the Walloon Region (Belgium).

References

- [1] Watson ED, Barbacini S, Berrocal B, Sheerin O, Marchi V, Zavaglia G, et al. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. Theriogenology 2001;56:123–31.
- [2] Katila T. Uterine defence mechanisms in the mare. Anim Reprod Sci 1996;42:197–204.
- [3] Troedsson MH, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. Anim Reprod Sci 2001;68:273–8.
- [4] LeBlanc MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. Reprod Domest Anim 2010;45:21–7.
- [5] Liu IK, Troedsson MH. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. Theriogenology 2008;70:415–20.
- [6] Hurtgen JP. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. Theriogenology 2006;66:560–6.
- [7] LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. Reprod Domest Anim 2009;44(Suppl 3):10–22.
- [8] Traub-Dargatz JL, Salman MD, Voss JL. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. J Am Vet Med Assoc 1991; 198:1745–7.

- [9] Pycock JF, Allen WE. Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. *Vet Rec* 1988;123:193–5.
- [10] Pycock JF, Allen WE. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Vet J* 1990;22:422–5.
- [11] Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 1994;41:629–36.
- [12] Troedsson MH. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 1999;52:461–71.
- [13] Burleson MD, LeBlanc MM, Riddle WT, Hendricks KEM. Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. *Anim Reprod Sci* 2010;121:103.
- [14] Samper JC. How to interpret endometrial edema in brood mares. Proceeding Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Orlando, Florida, 2007;571–572.
- [15] Katila T, Lock TF, Hoffmann WE, Smith AR. Lysozyme, alkaline phosphatase and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology* 1990;33:723–32.
- [16] Zerbe H, Schubert HJ, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W. Development and comparison of *in vivo* and *in vitro* models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* 2003;60:209–23.
- [17] Nielsen JM. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 2005;64:510–8.
- [18] Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Horohov DW, Scoggan KE, Squires E, et al. An investigation of uterine nitric oxide production in mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effects of immunomodulation. *Reprod Domest Anim* 2013;48:554–61.
- [19] Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA. Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Anim Reprod Sci* 2010;119:31–9.
- [20] Sattler T, Fürll M. Creatine kinase and aspartate aminotransferase in cows as indicators for endometritis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2004;51:132–7.
- [21] Art T, Franck T, Gangl M, Votion D, Kohnen S, Deby-Dupont G, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition. *Equine Vet J* 2006;38:298–302.
- [22] Grulke S, Franck T, Gangl M, Peters F, Saliccia A, Deby-Dupont G, et al. Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease. *Can J Vet Res* 2008;72:37–42.
- [23] Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann de Médecine Vétérinaire* 2003;147:79–93.
- [24] Franck T, Grulke S, Deby-Dupont G, Deby C, Duvivier H, Peters F, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific equine neutrophil myeloperoxidase measurement in blood. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:412–9.
- [25] Ponthier J, Franck T, Mottart E, Serteyn D, Deleuze S. Equine frozen semen parameters in relation with total myeloperoxidase concentration. *Anim Reprod Sci* 2008;107:341–2.
- [26] Ponthier J, Franck T, Detilleux J, Mottart E, Serteyn D, Deleuze S. Association between myeloperoxidase concentration in equine frozen semen and post-thawing parameters. *Reprod Domest Anim* 2010;45:811–6.
- [27] Ponthier J, De la Rebière G, Desvals M, Spalart M, Franck T, Serteyn D, et al. Is neutrophil elastase associated with myeloperoxidase concentration and post-thawing parameters in equine frozen semen? *Anim Reprod Sci* 2010;121:200–2.
- [28] Ponthier J. Origine et effet de la myéloperoxydase lors de la congélation du sperme d'étales, Département des Sciences Cliniques des animaux des Compagnie et des équides. Faculté de Médecine Vétérinaire: Université de Liège, 2012.
- [29] Samper JC. How to deal with uterine edema? *Equine reproduction Seminar, IJsselhallen, Zwolle*, 2009.
- [30] Purswell BJ, Ley WB, Sriranganathan N, Bowen JM. Aerobic and anaerobic bacterial flora in the postpartum mare. *J Equine Vet Sci* 1989;9:141–4.
- [31] McKinnon AO, Squires E, Carnevale EM, Harrison LA, Frantz DD, McChesney AE, et al. Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare. Proceeding Am Assoc Equine Pract 1987;605–22.
- [32] Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al. Chapter 6-Endometritis, manual of equine reproduction (third edition). Saint Louis: Mosby; 2011. p. 73–84.
- [33] Pycock JF, Newcombe JR. The relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis, and pregnancy rate in the mare. *Equine Vet J* 1996;22:19–22.
- [34] Samper JC. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. Proceeding Am Assoc Equine Pract 1997;189–91.
- [35] Ginther OJ, Pierson RA. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology* 1984;21:505–16.
- [36] Riddle WT, LeBlanc MM, Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology* 2007;68:395–402.
- [37] LeBlanc MM. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology* 2008;70:421–9.
- [38] Deby-Dupont G, Grulke S, Caudron I, Mathy-Hartert M, Benbarek H, Deby C, et al. Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radio-immunoassay and first results in septic pathologies. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66:257–71.
- [39] Daspet SM, Ponthier J, Jolly S, Deleuze S. Cytological diagnosis of endometritis in mares: a comparative study. *Reprod Domest Anim* 2010;45:64.
- [40] Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* 2011;75:1311–8.
- [41] Ponthier J, Desvals M, Franck T, de la Rebière G, Spalart M, Palmer E, et al. Myeloperoxidase in equine semen: concentration and localization during freezing processing. *J Equine Vet Sci* 2012;32:32–7.
- [42] Ponthier J, Teague SR, Franck TY, de la Rebière G, Serteyn DD, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Varner DD, Deleuze SC. Effect of non-sperm cells removal with single-layer colloidal centrifugation on myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. *Theriogenology* 2013;80:1082–7.



Article

Characterization of Myeloperoxidase in the Healthy Equine Endometrium

Sonia Parrilla Hernández ¹, Thierry Franck ², Carine Munaut ³, Émilie Feyereisen ³, Joëlle Piret ⁴, Frédéric Farnir ⁵, Fabrice Reigner ⁶, Philippe Barrière ⁶ and Stéfan Deleuze ^{1,7,*}

- ¹ Physiology of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium
² Center for Oxygen Research and development (CORD), University of Liège, 4000 Liège, Belgium
³ Laboratory of Tumor and Developmental Biology, GIGA-Cancer, University of Liège, 4000 Liège, Belgium
⁴ Department of Morphology and Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium
⁵ Biostatistics and bioinformatics applied to veterinary sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium
⁶ UE1297 PAO, INRAE, 37380 Nouzilly, France
⁷ Equine and Companion Animal Reproduction, Veterinary Medicine Faculty, University of Liège, 4000 Liège, Belgium
* Correspondence: s.deleuze@uliege.be

Simple Summary: Endometritis or endometrial inflammation is a major cause of infertility in mares. Understanding how the immune system protects the uterus against potential pathogens and contamination is essential for preventing endometritis and other associated pathologies. Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme mainly contained in inflammatory cells and indeed associated with equine endometritis. Surprisingly, this enzyme is also detected in the uterus of mares in absence of inflammation. The aim of this study was to investigate MPO in the uterus of mares in physiological conditions throughout the reproductive cycle to better understand its function in equine reproduction. MPO is constantly present in the uterus of mares in all phases of the reproductive cycle. This MPO, in absence of inflammatory cells, seems to be synthesized and secreted in the uterine lumen by the uterine cells themselves, especially in estrus, when the equine uterus is most exposed to external contamination. Based on these results and its potent bactericidal action, we suggest that MPO is probably part of the uterine immune system protecting the uterus against contamination and avoiding inflammation.

Abstract: Myeloperoxidase (MPO), as a marker of neutrophil activation, has been associated with equine endometritis. However, in absence of inflammation, MPO is constantly detected in the uterine lumen of estrous mares. The aim of this study was to characterize MPO in the uterus of mares under physiological conditions as a first step to better understand the role of this enzyme in equine reproduction. Total and active MPO concentrations were determined, by ELISA and SIEFED assay, respectively, in low-volume lavages from mares in estrus ($n = 26$), diestrus ($n = 18$) and anestrus ($n = 8$) in absence of endometritis. Immunohistochemical analysis was performed on 21 endometrial biopsies randomly selected: estrus ($n = 11$), diestrus ($n = 6$) and anestrus ($n = 4$). MPO, although mostly enzymatically inactive, was present in highly variable concentrations in uterine lavages in all studied phases, with elevated concentrations in estrus and anestrus, while in diestrus, concentrations were much lower. Intracytoplasmic immunoexpression of MPO was detected in the endometrial epithelial cells, neutrophils and glandular secretions. Maximal expression was observed during estrus in mid and basal glands with a predominant intracytoplasmic apical reinforcement. In diestrus, immunopositive glands were sporadic. In anestrus, only the luminal epithelium showed residual MPO immunostaining. These results confirm a constant presence of MPO in the uterine lumen of mares in absence of inflammation, probably as part of the uterine mucosal immune system, and suggest that endometrial cells are a source of uterine MPO under physiological cyclic conditions.

Citation: Parrilla Hernández, S.; Franck, T.; Munaut, C.; Feyereisen, É.; Piret, J.; Farnir, F.; Reigner, F.; Barrière, P.; Deleuze, S. Characterization of Myeloperoxidase in the Healthy Equine Endometrium. *Animals* **2023**, *13*, 375. <https://doi.org/10.3390/ani13030375>

Academic Editors: Jordi Miró Roig and Graça Ferreira-Dias

Received: 14 December 2022

Revised: 18 January 2023

Accepted: 18 January 2023

Published: 21 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: myeloperoxidase; equine; immunohistochemistry; endometrial mucosal immune system

1. Introduction

The pro-oxidant enzyme Myeloperoxidase (MPO) is one of the key mediators in neutrophil functions [1] and considered as a marker of neutrophil activation. It contributes to neutrophil defense functions by the production, in presence of H_2O_2 , of potent oxidant agents responsible for microbial cell damage [2]. MPO is mainly contained in azurophilic granules of neutrophils [3] playing an important role in the intracellular microbial killing after phagocytosis. It is also involved in the extracellular clearance of several pathogens when released into the extracellular medium by degranulation, cell lysis as well as a constituent of neutrophil extracellular traps (NETs) [4]. Nevertheless, despite their protective role as a potent antimicrobial, when overabundant or upregulated in the extracellular medium, the oxidant capacities of MPO products can be detrimental for host cells and tissues [2]. Accordingly, MPO has been associated with the development of some inflammatory and fibrotic diseases in different organs [5–8]. The synthesis and expression of MPO have been exclusively related to myeloid cells, mainly neutrophils [9]. However, MPO has recently been described to be contained in non-myeloid cells [10–13]. Non-inflammatory cells are able to capture MPO from the extracellular medium [14,15], and through direct contact with neutrophils [16]. More interestingly, the capacity of non-myeloid cells to express endogenous MPO has been demonstrated in cells of the reproductive tract of rams and human neurons under physiological conditions [10,11], as well as in human endothelial cells as a response to oxidative stress [17].

In horses, MPO has been identified, both under active and inactive form, in various fluids and tissues [18–21] and has been shown to be involved in numerous inflammatory processes [18,19,22–24]. Some studies have focused on MPO and its implications in pathological conditions of the endometrium, such as endometritis and endometrosis [24–27], which are a major cause of infertility in the mare that adversely impact the horse breeding industry. Parrilla-Hernandez et al. [24] showed that in the equine endometrium in estrus, MPO concentrations were higher when associated with a positive endometrial cytology. However, in the same study, MPO was also detected at variable concentrations in all the studied mares even in the absence of neutrophils. Similarly, an association between MPO and the number of neutrophils has not been observed in uterine samples of cows for several weeks after calving [28]. These results suggest a constitutive presence of MPO, not exclusively related to inflammation [24] that has yet to be investigated. While presence of MPO in the endometrium has been observed by immunohistochemistry and Western blot in rats, before and after an induced inflammation [13], no such report has been published in mares.

MPO has also been studied as a component of NETs in the equine endometrium and it has been suggested to be involved in the development of endometrial fibrosis [25,26,29]. Thus, the presence of MPO in the uterus of mares raised the question about a possible pathological action of the enzyme in the equine endometrium and its association with different equine endometrial diseases. The measurement of MPO in uterine fluid as a protein provides information about the abundance of the molecule, under its native form or its precursor. However, the enzymatic activity, defined as the capacity of the enzyme to produce oxidant agents, can vary considerably between individuals [30,31] and is directly responsible for the effects on the equine endometrium. This has been demonstrated in vitro, in a study that showed that the inhibition of the enzyme decreases the MPO profibrotic effect [29]. Therefore, the evaluation not only of the enzyme but also of its activity is crucial to understand its possible effect in mares' endometrium.

This study aims to characterize the presence, activity and localization of MPO in the healthy uterus of mares during the different phases of the reproductive cycle, as a first step to understand its physiological and/or pathological role in equine reproduction.

2. Materials and Methods

All procedures on animals were conducted in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals issued by the French Ministry of Agriculture and with the approval of the ethical review committee (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire) under number APAFIS#5084-201604142152987 v2.

2.1. Animals and Samples Collection

The study was performed on adult research pony mares housed in the Experimental Unit of Animals Physiology of l'Orfrasière (UEPAO; INRAE Val de Loire 1297, Nouzilly, France) between March 2016 and January 2017. Thirty-six Welsh pony mares, aged 5 to 18 years were included and 57 sets of samples were recovered. At sampling, seven mares were maiden while the other 29 mares had foaled at least once. Samples were obtained from mares once ($n = 18$), twice ($n = 15$) or three times ($n = 3$) during the reproductive season.

Mares were examined by transrectal palpation and ultrasonography for genital health and to determine the reproductive stage. Data and samples were obtained during the breeding season from 29 mares in estrus (showing a dominant follicle and endometrial oedema) and 18 mares in diestrus (presenting a corpus luteum in absence of oedema). Ten mares in seasonal anestrus (exhibiting no follicle greater than 15 mm and no corpus luteum) were also included in the study. Blood samples were collected by jugular venipuncture from those mares and plasma concentration of progesterone lower than 1 ng/mL [32] on two evaluations seven days apart confirmed the seasonal anestrus.

After scrubbing of the vulva and peritoneum, a low-volume uterine lavage was performed with 60 mL of saline solution using a bovine embryo flushing catheter (Minitüb, Tiefenbach, Germany). After a transrectal uterine massage, the fluid was collected in a 50 mL graduated conical tube by gravity flow and samples were centrifuged at 600 g for 10 min immediately. Supernatants were collected in 2 mL tubes and kept at -20°C for further analysis.

Immediately after the lavage, an endometrial biopsy sample was obtained from the proximal region of one uterine horn using an alligator jaw biopsy instrument (Krusse, Langeskov, Denmark). Biopsy samples were fixed in 10% formalin and then embedded in paraffin.

2.2. Histology

Endometrial biopsies were stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination by light microscopy. Slides were examined for the presence of neutrophils within the luminal epithelium and the stratum compactum. Infiltration of three or more neutrophils in estrus [33] and one or more neutrophils in diestrus [34,35] and anestrus [34] per five fields at high magnification (40 \times) was considered as evidence of endometritis. Additionally, biopsy specimen were routinely classified using the grading system of Kenney and Doig [36], modify by Schoon et al. [37].

2.3. Total Myeloperoxidase by ELISA Assay

Concentrations of total MPO in the supernatant of the low-volume uterine lavages were determined by a commercial equine ELISA kit (Bioparis SA, Liege, Belgium) as previously described [24,38]. After a preliminary screening, each sample was assayed at the dilution 50 \times and/or 500 \times . Each sample was assayed twice and the mean value was calculated. MPO concentration was below the detection limit (<1.3 ng/mL) for 3.8% of the samples. Concerning the remaining 96.2% of samples with a detected MPO concentration, 68%

had an intra-assay coefficient of variation (CV) between 0.6% and 18.7%. Samples with higher CVs mainly correspond to samples assayed at both dilutions. For those samples, the concentration corresponding to the dilution 50 \times was considered.

2.4. Active Myeloperoxidase by SIEFED Assay

Active MPO concentration in the supernatant of the low-volume uterine lavage was determined by specific immuno-extraction followed by enzymatic detection (SIEFED) assay [39]. Each sample was assayed twice and the mean value was calculated. Active MPO was below the detection limit (<0.051 ng/mL), in 23% of the samples. For the remaining samples (77%), 70% of them showed active MPO with intra-assay CVs ranged between 0.6 and 15.4%. The samples showing CVs greater than 16% mainly correspond to those situated at the lower limit of detection of the calibration curve.

2.5. Protein Concentration

The total protein concentration in the supernatant of low-volume uterine lavage was measured by the bicinchoninic acid method for protein determination (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA).

2.6. Immunochemistry

Four micrometer thick tissue sections of paraffin blocks from mares in estrus ($n = 11$), diestrus ($n = 6$) and anestrus ($n = 4$) were deparaffinized and rehydrated following a classical protocol. Heat induced epitope retrieval was carried out in target retrieval solution pH 6 (Dako S1699, Santa Clara, CA, USA,) in autoclave for 11 min at 126 °C followed by a cool down for 20 min and rinse in distilled water for 5 min at room temperature. Endogenous peroxidases were subsequently blocked by 3% H₂O₂/H₂O for 20 min at room temperature and slides were then rinsed with distilled water (2 \times). To inhibit non-specific staining, samples were incubated in Protein Block Serum Free (Dako X0909, Santa Clara, CA, USA) at room temperature for 10 min. Slides were first incubated for 60 min at room temperature with rabbit anti-MPO antibody obtained against purified equine MPO [38] (1/1500) and then with a HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Envision System-Labeled Polymer-HRP, DAKO, K4003), for 30 min at room temperature. After washing with PBS 5 times for 5 min, color development was achieved by applying diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO K3468, Santa Clara, CA, USA) solution for 3 min. Slides were finally counterstained with hematoxylin and protected by a coverslip for microscope observation. Slides from a confirmed case of equine meningitis were used as a positive control. For negative controls, the primary antibody was omitted.

2.7. Semiquantitative Evaluation of the Myeloperoxidase Immunoexpression

For assessment of a precise MPO immunostaining in endometrial tissues, the percentage of immunopositive cells as well as their staining intensities were used to determine the immunoreactive score (IRS) (adapted from [40]). To this purpose, the percentage of immunopositive cells (PP) within five representative areas (40 \times) of each cell population was determined. For each immunostained cell, the staining intensity (SI) was evaluated and assigned a numerical value (0 = none; 0.5 = very weak or dot-like pattern; 1 = weak; 2 = moderate; 3 = strong). The IRS was determined according to the formula:

$$5$$

$$IRS = \frac{1}{100} \sum [PP_n \times SIn]$$

$$n = 1$$

This was performed in general for each endometrial tissue sample and separately for the following epithelial cell populations: the luminal epithelium (LE), the glandular ducts (GD), as well as the mid glands (MG) and basal glands (BG).

2.8. Statistical Analysis

In order to limit the effect of dilution and allow comparison between samples, results are expressed as total or active MPO/total protein ratio, referred to as R_T and R_A , respectively. A general linear mixed model (SAS version 9.3) was used to compare data between groups including post hoc test and results are expressed as least square means. When the model did not converge, a general linear model was used to compare groups. GraphPad Prism version 9 was used to perform other statistical analyses. Normal distribution of parameters was tested with the Shapiro–Wilk normality test. Values of MPO concentration and total protein were non-normally distributed, and IRS values were normally distributed. Correlations were evaluated using the Spearman test. Statistical significance was established at p -value less than 0.05.

3. Results

3.1. Histology Evaluation

A small number of smears showed tissular infiltration of neutrophils in endometrial biopsies (estrus $n = 3$; diestrus $n = 0$; anestrus $n = 2$). Since uterine biopsy is accepted as a “gold standard” for the diagnosis of endometritis, samples were considered physiological and included in the study when no inflammation was detected using this method. A total of 52 samples: eight samples obtained in anestrus, 18 in diestrus and 26 in estrus, were then included. All mares presented no or mild endometrial fibrosis except one showing a moderate degree of fibrosis.

3.2. Myeloperoxidase

Myeloperoxidase was detected in all uterine lavage fluids except for a sample obtained in diestrus and a sample obtained in anestrus whose concentration of total MPO was below the detection limits of the assay. Active MPO concentration was below the detection limits of the assay for 12 samples across all groups. Values of active and total MPO concentration are shown in Table 1. The estrus phase showed higher concentrations of total MPO compared to the other groups. Maximal values of active MPO were observed in anestrus.

Table 1. Least squares means (\pm standard error) values of total and active myeloperoxidase (MPO), protein, total MPO/total protein ratio (R_T) and active MPO/total protein ratio (R_A) in uterine lavages in mares in the studied phases: anestrus, diestrus and estrus.

| | Total MPO (ng/mL) | Active MPO (ng/mL) | Protein (mg/mL) | R_T (ng/mg) | R_A (ng/mg) |
|----------|----------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Anestrus | 3798 (\pm 3464) * | 4.42 (\pm 0.84) * | 0.24 (\pm 0.26) * | 18512 (\pm 3994) * | 22.08 (\pm 3.46) * |
| Diestrus | 2319 (\pm 2334) * | 0.52 (\pm 0.54) ^b | 0.41 (\pm 0.17) * | 4320 (\pm 2517) ^b | 1.75 (\pm 2.04) ^b |
| Estrus | 8867 (\pm 1947) * | 0.85 (\pm 0.36) ^b | 0.77 (\pm 0.14) * | 13930 (\pm 2132) * | 1.48 (\pm 1.06) ^b |

Values with a different superscript within the same column are statistically different $p < 0.05$.

3.3. Protein Concentration

The total protein concentration in uterine lavages (Table 1) varied individually, but no statistical differences were observed between groups.

Concentration of total MPO was positively correlated with the total protein concentration in estrus ($r = 0.6623$; $p < 0.001$) and in diestrus ($r = 0.7155$; $p < 0.001$), but not in anestrus. However, no correlation between total protein and active MPO concentrations was observed in any of the groups (Figure 1).

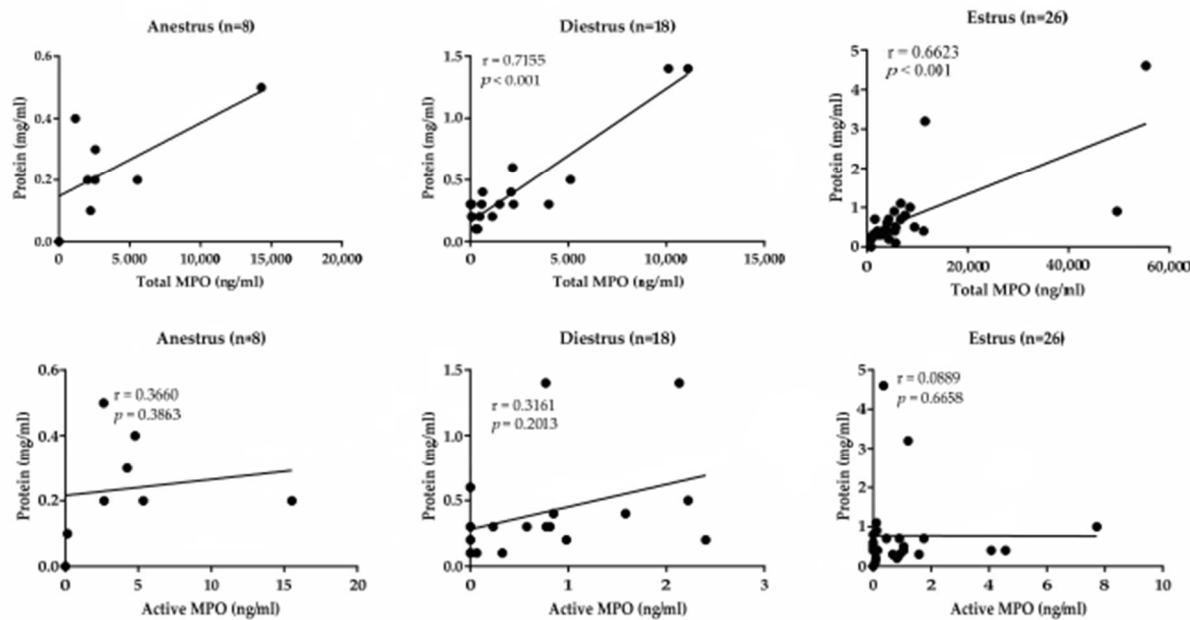


Figure 1. Association between total protein concentration and total and active myeloperoxidase (MPO) levels in uterine lavages in mares in the studied phases: anestrus, diestrus and estrus. p values < 0.05 are considered as significant.

3.4. Total Myeloperoxidase/Total Protein Ratio (R_T)

R_T for the different groups is given in Table 1. R_T values varied between samples and groups, with values ranging from 243.57 to 54,807 ng/mg of proteins. A significant difference between the studied groups ($p < 0.005$) was observed. In diestrus, R_T was significantly lower than in estrus ($p < 0.005$) and anestrus ($p < 0.005$). However, no significant differences were found between the anestrus and estrus groups (Figure 2a).

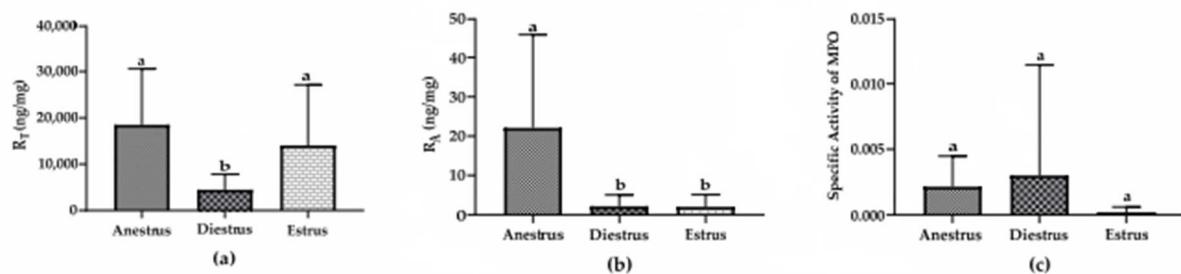


Figure 2. Myeloperoxidase (MPO) in uterine fluid of mares in anestrus, diestrus and estrus in absence of inflammation: (a) Total MPO/total protein ratio (R_T), (b) Active MPO/total protein ratio (R_A), (c) Specific Activity of MPO (active MPO/total MPO). Data are displayed as raw data (mean with SD). Columns with a different superscript are statistically different ($p < 0.05$).

3.5. Active Myeloperoxidase/Total Protein Ratio (R_A)

R_A values for the different groups are given in Table 1. When active MPO was detected, R_A was generally low, with values ranging from 0.008 to 72.21 ng/mg of proteins.

We observed a significant difference of R_A between the studied groups ($p < 0.0001$). R_A was higher in anestrus than in estrus ($p < 0.0001$) and diestrus ($p < 0.0001$). Nevertheless,

no significant differences were found between the estrus and diestrus groups (Figure 2b). No correlation was observed between R_f and R_A for any of the groups.

3.6. Specific Activity of Myeloperoxidase

Specific activity of MPO was expressed as the ratio of active MPO versus total MPO measurements. Values were very low in all studied samples and showed a high within-group variability but no statistical differences between groups were observed (Figure 2c).

3.7. Immunohistochemistry

3.7.1. MPO Expression in the Endometrium

Neutrophils were immunohistologically stained in all samples working as a positive control of the MPO immunostaining. MPO staining was also detected in epithelial and stromal cells in the endometrium of mares as well as in secretory products within the glandular lumen. Endometrial expression of MPO was different between mares and was influenced by the reproductive phase (Figure 3).

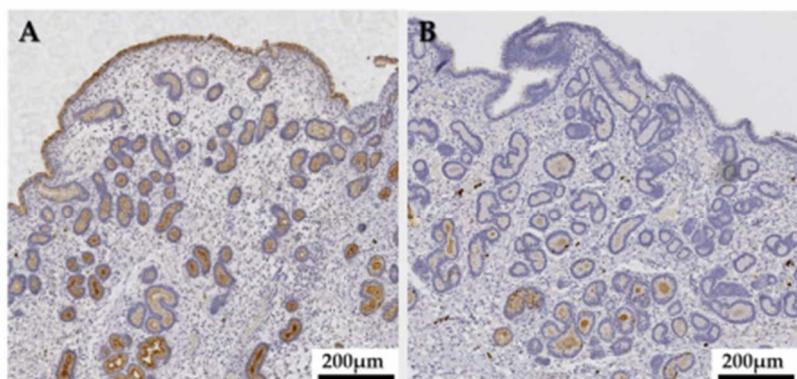
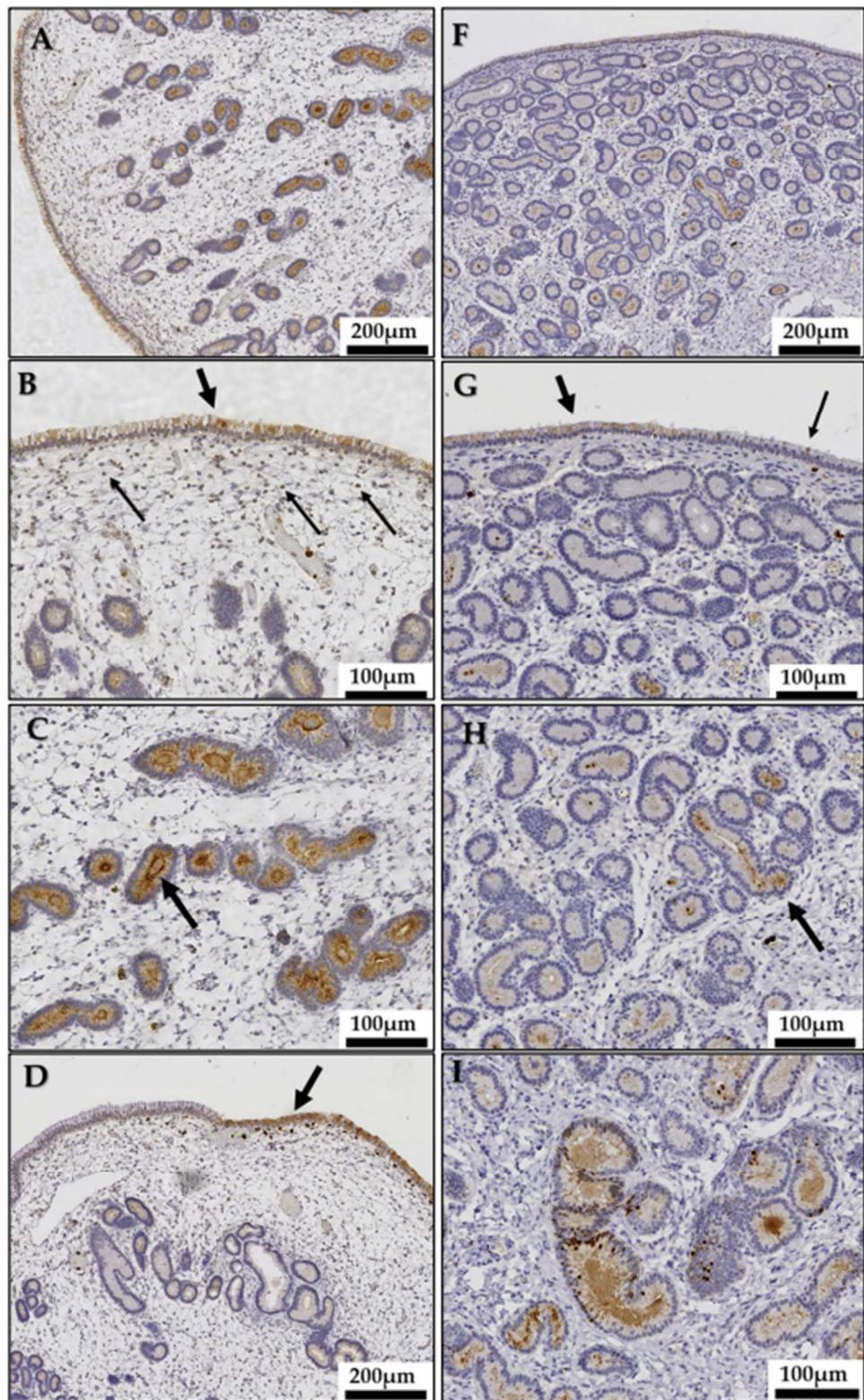


Figure 3. Immunohistochemistry. Endometrial myeloperoxidase (MPO) expression: comparison of MPO immunostaining of a mare through the same estrus cycle, (A) in estrus, a widespread distribution of immunopositive endometrial cells is observed; (B) In diestrus, endometrial cells showed only residual immunostaining. Magnification 10 \times .

Maximal MPO immunoreaction was detected during estrus. In this phase of the cycle, a widespread expression of MPO was observed in uterine glands where the staining intensity increased with depth (Figure 4A). Middle to deep glands showed a uniform, predominantly apical, reaction pattern (Figure 4C), whereas in the duct parts of the glands, the cytoplasmic staining was mostly diffuse. A nuclear staining of individual cells could occasionally be detected in endometrial glands. In diestrus, cytoplasmic MPO expression was not generalized and only some glands (mostly basal) were immunopositive (Figure 4F,H). Glandular cells showing a simultaneous cytoplasmic and nuclear or solely nuclear MPO immunostaining were more frequently found in diestrus than in estrus (Figure 4I).

The adluminal epithelium was irregularly marked, although a more generalized pattern was observed in estrus when compared to diestrus. An intracytoplasmic diffuse mosaic-like staining reaction was observed in immunopositive areas where cells with different staining intensities were mixed with immunonegative cells (Figure 4B,G). Nevertheless, in some mares presenting neutrophils in sub and transepithelial areas, a uniform cellular immunostaining was predominant (Figure 4D).



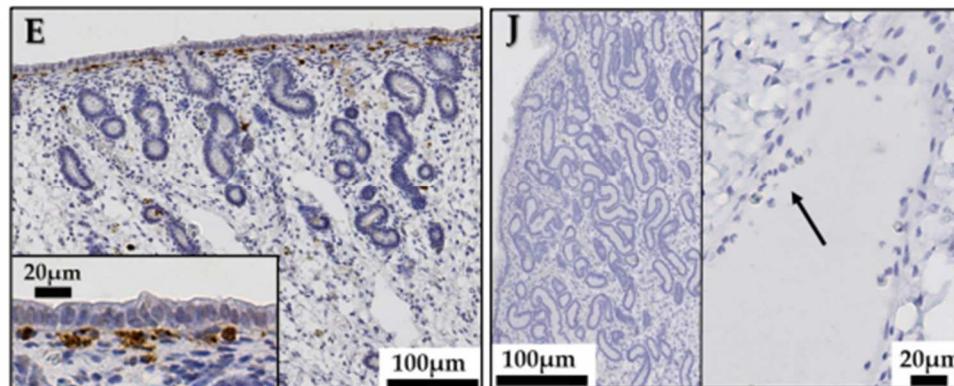


Figure 4. Immunohistochemistry. Equine endometrial myeloperoxidase (MPO) expression during the estrus cycle and seasonal anestrus. Images represent endometrial tissue samples from different mares in estrus (A–D), anestrus (E) and diestrus (F–I). Estrus: (A) Endometrial epithelial cells show a generalized MPO expression. The staining intensity in glandular cells increases with depth. Magnification 10×. (B) The adluminal epithelium shows a generalized intracytoplasmic diffuse mosaic-like staining reaction (thick arrow). A uniform intracytoplasmic pattern expression is observed in stromal cells (thin arrows). Magnification 20×. (C) Middle and basal uterine glands show a uniform, predominantly apical (arrow), intracytoplasmic diffuse pattern expression. Magnification 20×. (D) In presence of neutrophils in sub and transepithelial areas, the adluminal epithelium shows a uniform intracytoplasmic diffuse staining reaction (arrow). Magnification 20×. Anestrus: (E) Glandular endometrial cells are immunonegative. Magnification 10×. Inset: the luminal epithelium shows no or only a residual staining. Neutrophils in sub-epithelial capillaries are positively stained. Magnification 40×. Diestrus: (F) The epithelial cells immunostaining is not generalized. Magnification 10×. (G) The adluminal epithelium is irregularly marked. An intracytoplasmic diffuse mosaic-like staining reaction is observed in immunopositive areas (thick arrow) near immunonegative areas (thin arrow). Magnification 20×. (H) Endometrial glands show a sporadic MPO immunostaining (arrow). Magnification 20×. (I) Some basal glands show a nuclear immunostaining of individual cells sometimes accompanied by an intracytoplasmic diffuse staining. Magnification 20×. (J) Negative control showing no MPO in endometrial epithelial cells (left image, magnification 10×); and in neutrophils (right image, arrow, magnification 40×).

Stromal cells, mostly in the stratum compactum, were only scarcely immunopositive, showing a diffuse pattern in both phases of the cycle (Figure 4B).

In anestrus, only residual perinuclear MPO staining could be observed in luminal epithelial cells while the rest of the endometrial cell populations were immunonegative (Figure 4E).

3.7.2. Semiquantitative MPO Immunoexpression

General immunostaining of MPO, evaluated by the IRS, was statistically greater in estrus than in other groups. Similarly, except for luminal epithelium in diestrus, the IRS for each cell sub-population was statistically higher in estrus than during the other phases, with maximal differences found in mid and basal glands. No such differences were observed between diestrus and anestrus (Figure 5).

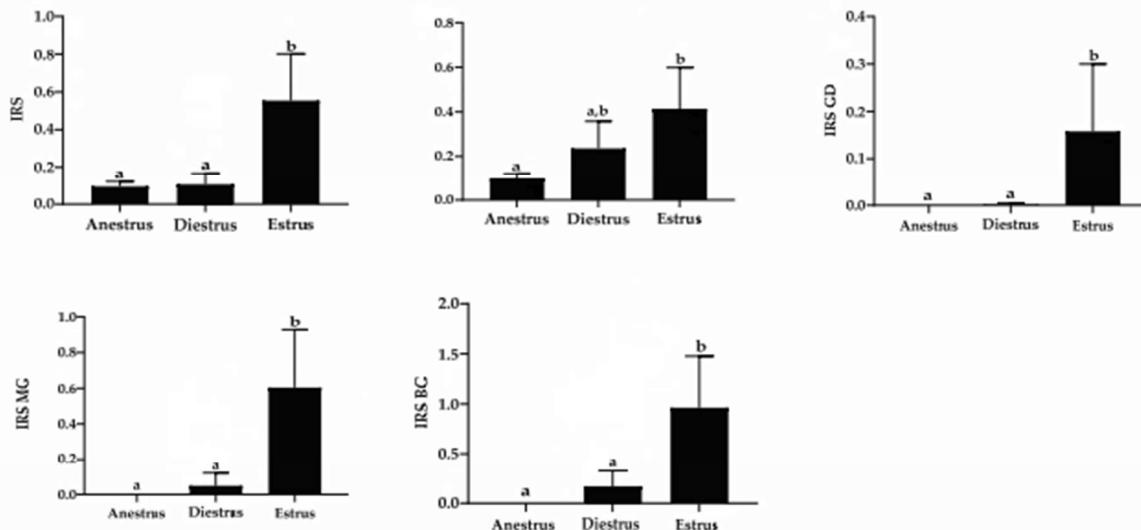


Figure 5. Myeloperoxidase immunoreactive score (IRS) among the studied phases in general and for each cell population. Data are displayed as raw data (mean with SD). Columns with a different superscript are statistically different ($p < 0.05$). LE: luminal epithelium; GD: glandular ducts; MG: mid glands; BG: basal glands.

In estrus, the maximal MPO expression was observed in basal glands. This was not observed in diestrus where IRS values between basal glands and luminal epithelium were not statistically different (Figure 6). MPO expression in endometrial tissues did not correlate with either R_t or R_A in the uterine fluid for the different studied cell populations and groups.

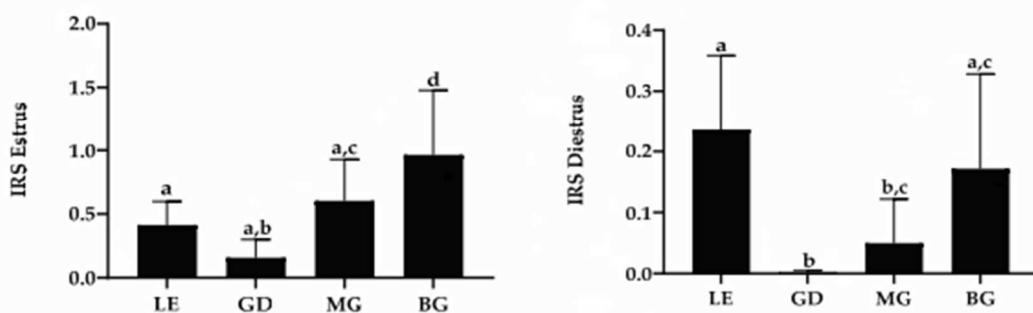


Figure 6. Myeloperoxidase immunoreactive score (IRS) in estrus and diestrus for each cell population. Data are displayed as raw data (mean with SD). Columns with a different superscript are statistically different ($p < 0.05$). LE: luminal epithelium; GD: glandular ducts; MG: mid glands; BG: basal glands.

4. Discussion

Myeloperoxidase is mainly contained and released by neutrophils and hence considered as a marker of inflammation in different organs and tissues [5]. Presence of MPO in uterine lavage fluids at variable concentrations has been demonstrated in mares during estrus regardless of the presence of neutrophils [24]. This is concordant with the results of

the present study, where total MPO (R_t) was detected at highly variable concentrations in uterine lavage fluids of mares in all phases in physiological conditions. This suggests a consistent presence of MPO in the equine uterine lumen, not exclusively related to inflammation.

The main source of MPO in blood are neutrophils [41]. However, the number of neutrophils in our samples were within the physiological limits in mares for every reproductive phase [33–35,42]. In a healthy, non-inflamed mare uterus, only few neutrophils may be found in the endometrium during estrus, while during diestrus, they are practically non-existent [42]. For a long time, it was accepted that MPO gene expression, and consequently its biosynthesis, was exclusively associated with myeloid precursors [9], but recently the enzyme has been localized in some non-myeloid cells in inflammatory and physiological conditions in different organs [10–13]. For the first time, our study shows the immunohistochemical expression of MPO in equine endometrial cells.

MPO was contained in epithelial, and to a lesser extent, stromal cells, showing different staining patterns depending on the cell populations, suggesting functional differences between the distinct endometrial cells, as observed for other proteins [43–46]. Mid and basal glands showed maximal MPO expression and an apical reinforcement of the staining that, together with the fact that intra-luminal glandular secretions were also immunopositive, suggest an intracellular synthesis followed by an intraluminal secretion of MPO by uterine glands [12,43,47]. Maximal MPO expression was detected in estrus all over the endometrium, while in diestrus, an important diminution of staining and sporadic distribution of the immunoreaction were observed as illustrated in Figure 3. This is concordant with the higher concentrations of MPO (R_t) in uterine lavage fluids detected in estrus compared to diestrus. Although this should be confirmed by transcriptomic and proteomic approach, such as *in situ* hybridization analysis, these results suggest that the endometrium may be a source of MPO in absence of endometritis.

In contrast to middle and basal glands, the diffuse MPO immunoreaction observed in the adluminal epithelium suggests an internalization of the enzyme rather than an intracellular synthesis. The two different patterns of immunostaining observed in the adluminal epithelium suggest different ways of MPO uptake by the epithelial cells. In zones where sub or transepithelial neutrophils were observed, epithelial cells were consistently positively stained, which could represent an MPO uptake by epithelial cells from neutrophils via cell-to-cell contact, as demonstrated *in vitro* in endothelial cells [16]. However, epithelial cells from zones of the adluminal epithelium where neutrophils were absent displayed no staining or a mosaic pattern. These variable intensities of labeling, may either illustrate the various amounts of MPO remaining after such an uptake or, alternatively, may result from an internalization of intraluminal MPO, as demonstrated *in vitro* for endothelial and lung epithelial cells [14,15]. Accordingly, the stromal cells were immunopositive in some samples probably also due to an MPO uptake as endometrial stromal cells appear to remove extravasated material from endometrial interstitium [48].

Some cells, mainly located in basal glands in diestrus samples, seemed to show a nuclear immunostaining occasionally associated with cytoplasmic staining. The nuclear localization can indicate a nuclear translocation of MPO and its involvement in the regulation of gene transcription as proposed for β -defensins in the equine endometrium [45]. As this nuclear staining was mostly observed in diestrus samples, it can be proposed that MPO nuclear translocation acts as a self-regulation mechanism targeting its gene transcription. At this point, our results do not allow to determine whether MPO adheres to the nuclear membrane as shown in horse muscle cells coincubated with MPO [49] or actually reaches inside the nucleus as demonstrated on murine peritoneal B-lymphocytes [50]. Further studies are necessary to confirm the exact localization of MPO at the nuclear level and to understand the functional significance of this nuclear staining.

Epithelial cells of the endometrium of mares, in addition to form an uninterrupted mucosal barrier between the lumen and the underlying cells and tissues, produce a variety of substances that maintain endometrial homeostasis and participate in reproduction [51].

Among others, uterine epithelial cells produce a range of natural unspecific microbicides, such as lactoferrin [52] and lysozyme [53], that confer protection against potential pathogens to uterine secretions and mucus. Those substances play an important role during the long estrus period in mares, when the cervix is open and relaxed and the ascending contamination of the uterus is facilitated. Although further investigations are needed to confirm it, based on the elevated concentration, expression and the apical staining pattern we observe in estrus, it seems logical to propose that MPO, being a potent bactericidal protein, is synthetized and secreted by the equine endometrium to participate to the mucosal immune system. Whether the secretion of MPO in the uterine lumen is constitutive and/or induced by a stimulus still needs to be investigated. In a study of Yang et al. [13] the immunohistochemical expression of MPO decreased in the endometrium of rats when a LPS-induced inflammation was induced. It can be speculated that this decrease of MPO expression is a consequence of a release of the intracytoplasmic MPO into the uterine lumen in reaction to the LPS-induced inflammation. Together with the constitutive presence of MPO in the equine endometrium observed in our study, these results suggest that MPO may be expressed by the endometrium to prevent a possible uterine contamination and inflammation, and is secreted into the uterine lumen in response to specific situations. This could partly explain the discrepancy between the intensity of the immunostaining and the intraluminal MPO (R_t) concentrations in our physiological samples, as illustrated by the lack of correlation between the IRS and MPO (R_t) concentrations. Functional data studies are necessary to further investigate the role of MPO in the uterus of mares and the consequences of its dysfunction.

The cyclical expression of MPO, as well as the total absence of glandular staining in endometrial cells in anestrus, is concordant with a protein expression regulated by steroid hormones. The activity of MPO in blood neutrophils seems to be regulated by the menstrual cycle in women [54,55] and an upregulation of MPO activity by estrogens has been suggested, probably through the direct stimulation of the expression of the MPO gene [55]. In uterine tissues of rats, MPO activity was reported to increase during the follicular phase of the cycle, decrease thereafter during the luteal phase, and reach minimal values in late diestrus samples [56]. However, in this paper, authors analyzed the peroxidase activity, which is common to all peroxidases and not an exclusive reaction of MPO. Nevertheless, these results agree with different studies showing that peroxidases in uterine tissue are upregulated by estrogens [57–60] via their receptors [61], while progesterone inhibits the estrogen-induction of uterine peroxidases. Our results show that a similar pattern of regulation also applies to MPO in the equine endometrium as the immunolabeling was marked in estrus, decreased in diestrus, and totally faded away in anestrus. This is further supported by the positive correlation between the concentration of MPO and total protein we observe in estrus and diestrus when steroids are secreted, while no such correlation exists in anestrus in the absence of significant concentrations of steroids.

Endometrial neutrophil population during anestrus has not been studied specifically yet. When evaluating the number of neutrophils as a marker of inflammation, the same threshold is often used in anestrus and diestrus because the blood–uterine barrier permeability is considered basal during these two phases, while it is increased under estrogen's influence [62]. However, this neglects the effect of progesterone in suppressing uterine immune defense [63], which may depress the migration of neutrophils into the uterine lumen [64]. In anestrus, when the uterus is not under the influence of steroid hormones, the immunity of the endometrium may be similar to other mucosal systems. In fact, our study showed that in anestrus samples, neutrophils were usually observed in subepithelial capillaries with sporadic transepithelial passage in a mare-dependent manner. This presence of neutrophils in the mucosal endometrium is probably physiological and adapted to the endometrial needs to control microbiota [65] as well as to face any possible contamination [63,66]. Activation of these endometrial neutrophils, as a part of the mucosal defense system, may be the origin of some of the MPO (R_t) encountered in anestrus samples.

Intraluminal accumulation of MPO from successive cycles and/or previous endometritis may contribute to the intraluminal MPO and may explain individual differences in MPO (R_t) concentrations observed between mares. The intraluminal fluid accumulation in mares during estrus has been associated with higher concentrations of MPO [24]. An impaired drainage of endometrial luminal fluid through the cervix and/or the lymphatic system may reduce the elimination of MPO from the uterus and favor its accumulation from one cycle to the next. Thus, the individual mare's capacity to eliminate MPO from the uterine lumen may explain the higher concentrations of MPO (R_t) in some diestrus samples, when for others, levels of the enzyme were below the limit of detection of the assay. Moreover, the accumulation of MPO originating from previous physiological cyclic phases or inflammatory episodes may explain the high concentrations of MPO (R_t) observed in some anestrus mares.

MPO has an important protective role in the innate immune defense [67]. However, by the same processes used in the destruction of pathogens, extracellular MPO can be detrimental for host cells and tissues (recently reviewed in [68,69]). Therefore, the constant presence of MPO in the uterine lumen raised the question about its possible contribution to the development of some endometrial pathologies. It has been suggested that MPO could be involved in the development of fibrosis in the equine endometrium [25,26]. Endometrial fibrosis is somehow connected to endometrial inflammation as persistent post breeding endometritis, which results in enhanced neutrophil recruitment and leads to increased fibrosis in mares [70]. In fact, mares diagnosed with endometritis present higher concentrations of MPO than those where no inflammation was observed [24]. Nevertheless, maiden mares, whose uterus has not been exposed to semen during their entire reproductive life, also develop endometrial fibrosis and its severity is correlated with age [71]. Thus, we can speculate that the constitutive expression and secretion of MPO by epithelial endometrial cells during the reproductive life may contribute to the natural progress of endometrial fibrosis, while the exposure to inflammation, particularly if persistent, and the subsequent increased release of MPO may accelerate and/or aggravate this process.

Previously, some mares with no sign of endometritis have been shown to have high concentrations of total MPO in the uterine lumen, similar to those presenting inflammation [24]. In the present study, MPO in uterine lavage fluids was mostly enzymatically inactive. Looking at the presence of active MPO (R_a) in the different reproductive phases, our results suggest the presence of regulating factors in the uterine fluid balancing the MPO activity to best suit the endometrial requirements for every reproductive situation and avoid the detrimental effects for host cells and tissues. A significant fraction of MPO is inactivated during phagocytosis when released in the extracellular medium [72,73] but the involved mechanisms of inhibition are not clear yet. In addition, some molecules seem to be able to inhibit plasma MPO by different mechanisms and at different degrees [74–77] but, to our knowledge, they have not been studied in uterine fluid yet. Furthermore, in equine sperm supernatant, where high concentrations of total MPO are also observed, Ponthier et al. [20] showed an important presence of MPO precursor. Unlike in the human [2], the enzyme precursor is inactive in the equine [38] and is then cleaved into the active subunit of the enzyme. Thus, the low MPO activity measured in the uterine fluids may be attributed to a significant presence of MPO precursor but also, to the presence of MPO inhibitors in these fluids. Further studies are needed to investigate the dynamics of MPO and its activity in the endometrium of mares in different reproductive situations.

Besides its balanced enzymatic functions, MPO has also been described to modulate neutrophil migration [78], increase TNF- α factor [79] and modulate cytokines [80]. These non-catalytic activities combined with our results during the physiological reproductive states of the uterus highlight the essential role of MPO in maintaining equine endometrial homeostasis even when not enzymatically active.

5. Conclusions

This is the first report characterizing MPO in the endometrium of healthy mares. MPO in the uterus of mares is constitutively present during the reproductive cycle and independent of inflammation, which indicates a physiological role of the enzyme in equine reproduction.

Although further studies are necessary to confirm our hypothesis, based on its hormone-dependent endometrial expression and its biological functions, we strongly suggest that equine endometrial cells are the main uterine source of MPO under physiological conditions, which as part of the uterine mucosal immune system in mares, contributes to the prevention of endometrial contamination and inflammation.

Author Contributions: Conceptualization, S.P.H. and S.D.; validation, T.F. and É.F.; formal analysis, S.P.H. and F.F.; investigation, É.F., J.P., F.R. and P.B.; resources, C.M., J.P., F.R. and P.B.; data curation, S.P.H.; writing—original draft preparation, S.P.H.; writing—review and editing, S.P.H., T.F., C.M. and S.D.; visualization, S.P.H.; supervision, S.D.; funding acquisition, S.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by F.S.R (Fonds Spéciaux pour la Recherche), University of Liège, Belgium.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of VAL de LOIRE (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire) under number APAFIS#5084-201604142152987 v2.

Data Availability Statement: Data is available under request to the authors.

Acknowledgments: The authors would like to thank Nadine Antoine, Cécile Douet, Dominique Cassart and Thomas Marichal for technical and scientific advice, as well as Evelyne Moyse and David Stern for statistical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Mayadas, T.N.; Cullere, X.; Lowell, C.A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2014**, *9*, 181–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>.
- Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: Friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *77*, 598–625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>.
- Borregaard, N.; Cowland, J. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* **1997**, *89*, 3503–3521.
- Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil Extra-cellular Traps Kill Bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535.
- Khan, A.A.; Alsahli, M.A.; Rahmani, A.H. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med. Sci.* **2018**, *6*, 33. <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>.
- Friedrichs, K.; Baldus, S.; Klinke, A. Fibrosis in Atrial Fibrillation—Role of Reactive Species and MPO. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 214. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00214>.
- Rudolph, V.; Andrié, R.P.; Rudolph, T.K.; Friedrichs, K.; Klinke, A.; Hirsch-Hoffmann, B.; Schwoerer, A.P.; Lau, D.; Fu, X.; Klingel, K.; et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 470–474. <https://doi.org/10.1038/nm.2124>.
- Pulli, B.; Ali, M.; Iwamoto, Y.; Zeller, M.W.; Schob, S.; Linnoila, J.J.; Chen, J.W. Myeloperoxidase–Hepatocyte–Stellate Cell Cross Talk Promotes Hepatocyte Injury and Fibrosis in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23*, 1255–1269. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6108>.
- Austin, G.E.; Zhao, W.-G.; Adjiri, A.; Lu, J.-P. Control of myeloperoxidase gene expression in developing myeloid cells. *Leuk. Res.* **1996**, *20*, 817–820. [https://doi.org/10.1016/s0145-2126\(96\)00032-x](https://doi.org/10.1016/s0145-2126(96)00032-x).
- Green, P.S.; Mendez, A.J.; Jacob, J.S.; Crowley, J.R.; Growdon, W.; Hyman, B.T.; Heinecke, J.W. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* **2004**, *90*, 724–733.
- Martínez-Marcos, P.; Carvajal-Serna, M.; Lázaro-Gaspar, S.; Pérez-Pé, R.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A.; Casao, A. Presence of melatonin-catabolizing non-specific enzymes myeloperoxidase and indoleamine 2,3-dioxygenase in the ram reproductive tract. *Reprod Dom. Anim.* **2019**, *54*, 1643–1650.

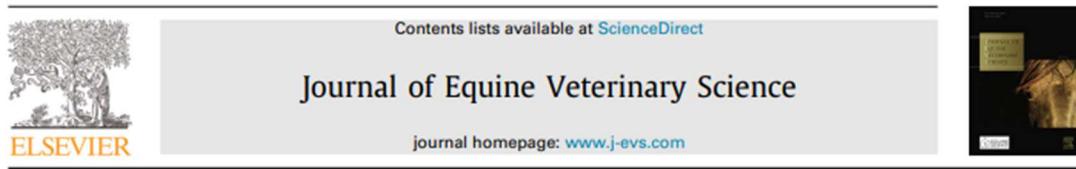
12. Roumeguère, T.; Delree, P.; Van Antwerpen, P.; Rorive, S.; Vanhamme, L.; Ryhove, L.D.L.K.D.; Serteyn, D.; Wespes, E.; Vanhaeverbeek, M.; Boudjeltia, K.Z. Intriguing location of myeloperoxidase in the prostate: A preliminary immunohistochemical study. *Prostate* **2011**, *72*, 507–513. <https://doi.org/10.1002/pros.21452>.
13. Yang, Z.; Xiao, K.; Wang, W.; Tang, J.; Sun, P.-P.; Peng, K.-M.; Song, H. The Effect of Visfatin on Inflammatory Reaction in Uterus of LPS-Induced Rats. *Int. J. Morphol.* **2015**, *33*, 194–203. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022015000100031>.
14. Haegens, A.; Vernooy, J.H.J.; Heeringa, P.; Mossman, B.T.; Wouters, E.F.M. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. *Eur. Respir. J.* **2008**, *31*, 252–260. <https://doi.org/10.1183/09031936.00029307>.
15. Yang, J.J.; Preston, G.A.; Pendergraft, W.F.; Segelmark, M.; Heeringa, P.; Hogan, S.L.; Jennette, J.C.; Falk, R.J. Internalization of Proteinase 3 Is Concomitant with Endothelial Cell Apoptosis and Internalization of Myeloperoxidase with Generation of Intracellular Oxidants. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 581–592. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64000-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64000-x).
16. Jerke, U.; Rolle, S.; Purfürst, B.; Luft, F.; Nauseef, W.; Kettritz, R. β 2 Integrin-mediated Cell-Cell Contact Transfers Active Myeloperoxidase from Neutrophils to Endothelial Cells*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 12910–12919. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.434613>.
17. La Rocca, G.; Di Stefano, A.; Eleuteri, E.; Anzalone, R.; Magno, F.; Corrao, S.; Loria, T.; Martorana, A.; Di Gangi, C.; Colombo, M.; et al. Oxidative stress induces myeloperoxidase expression in endocardial endothelial cells from patients with chronic heart failure. *Basic Res. Cardiol.* **2009**, *104*, 307–320.
18. Art, T.; Franck, T.; Lekeux, P.; de Moffarts, B.; Couëtil, L.; Becker, M.; Kohnen, S.; Deby-Dupont, G.; Serteyn, D. Myeloperoxidase concentration in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and those with recurrent airway obstruction. *Can. J. Vet. Res.* **2006**, *70*, 291–296.
19. Wauters, J.; Pille, F.; Martens, A.; Franck, T.; Serteyn, D.; Gasthuys, F.; Meyer, E. Equine myeloperoxidase: A novel biomarker in synovial fluid for the diagnosis of infection. *Equine Vet. J.* **2012**, *45*, 278–283. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00682.x>.
20. Ponthier, J.; Franck, T.; Parrilla-Hernandez, S.; Niesten, A.; De La Rebiere, G.; Serteyn, D.; Deleuze, S. Concentration, Activity and Biochemical Characterization of Myeloperoxidase in Fresh and Post-Thaw Equine Semen and their Implication on Freezability. *Reprod. Domest. Anim.* **2014**, *49*, 285–291. <https://doi.org/10.1111/rda.12270>.
21. Art, T.; Franck, T.; Gangl, M.; Votion, D.; Kohnen, S.; Deby-Dupont, G.; Serteyn, D. Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition. *Equine Vet. J.* **2006**, *38*, 298–302. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2006.tb05557.x>.
22. Grulke, S.; Franck, T.; Gangl, M.; Péters, F.; Salciccia, A.; Deby-Dupont, G.; Serteyn, D. Myeloperoxidase assay in plasma and peri-tonal fluid of horses with gastrointestinal disease. *Can. J. Vet. Res.* **2008**, *72*, 37–42.
23. Storms, N.; Torres, C.M.; Franck, T.; Guitart, A.S.; de la Rebière, G.; Serteyn, D. Presence of Myeloperoxidase in Lamellar Tissue of Horses Induced by an Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 6835. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.846835>.
24. Parrilla-Hernandez, S.; Ponthier, J.; Franck, T.Y.; Serteyn, D.D.; Deleuze, S.C. High concentrations of myeloperoxidase in the equine uterus as an indicator of endometritis. *Theriogenology* **2014**, *81*, 936–940. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.011>.
25. Rebordão, M.R.; Amaral, A.; Fernandes, C.; Silva, E.; Lukasik, K.; Szóstek-Mioduchowska, A.; Pinto-Bravo, P.; Galvão, A.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Enzymes Present in Neutrophil Extracellular Traps May Stimulate the Fibrogenic PGF_{2 α} Pathway in the Mare Endometrium. *Animals* **2021**, *11*, 2615. <https://doi.org/10.3390/ani11092615>.
26. Rebordão, M.R.; Amaral, A.; Lukasik, K.; Szóstek-Mioduchowska, A.; Pinto-Bravo, P.; Galvão, A.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology* **2018**, *113*, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.001>.
27. Rebordão, M.; Carneiro, C.; Alexandre-Pires, G.; Brito, P.; Pereira, C.; Nunes, T.; Galvão, A.; Leitão, A.; Vilela, C.; Ferreira-Dias, G. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *J. Reprod. Immunol.* **2014**, *106*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.08.003>.
28. Nazhat, S.A.; Kitahara, G.; Kozuka, N.; Mido, S.; Sadawy, M.; Ali, H.E.-S.; Osawa, T. Associations of periparturient plasma biochemical parameters, endometrial leukocyte esterase and myeloperoxidase, and bacterial detection with clinical and sub-clinical endometritis in postpartum dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* **2018**, *80*, 302–310.
29. Amaral, A.; Fernandes, C.; Rebordão, M.; Szóstek-Mioduchowska, A.; Lukasik, K.; Pinto-Bravo, P.; da Gama, L.T.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Myeloperoxidase Inhibition Decreases the Expression of Collagen and Metallopeptidase in Mare Endometria under In Vitro Conditions. *Animals* **2021**, *11*, 208. <https://doi.org/10.3390/ani11010208>.
30. Chapman, A.L.P.; Mocatta, T.J.; Shiva, S.; Seidel, A.; Chen, B.; Khalilova, I.; Paumann-Page, M.E.; Jameson, G.N.L.; Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. Ceruloplasmin Is an Endogenous Inhibitor of Myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6465–6477. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.418970>.
31. Segelmark, M.; Persson, B.; Hellmark, T.; Wieslander, J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): A major function of ceruloplasmin? *Clin. Exp. Immunol.* **1997**, *108*, 167–174.

32. Panzani, D.; Di Vita, M.; Lainé, A.-L.; Guillaume, D.; Rota, A.; Tesi, M.; Vannozzi, I.; Camillo, F. Corpus Luteum Vascularization and Progesterone Production in Autumn and Winter Cycles of the Mare: Relationship Between Ultrasonographic Characteristics of Corpora Lutea and Plasma Progesterone Concentration in the Last Cycles Before Anestrus. *J. Equine Vet. Sci.* **2017**, *56*, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.001>.
33. LeBlanc, M.M.; Magsig, J.; Stromberg, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* **2007**, *68*, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.038>.
34. Kozdrowski, R.; Sikora, M.; Buczkowska, J.; Nowak, M.; Raś, A.; Dzięcioł, M. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **2015**, *154*, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.009>.
35. Overbeck, W.; Witte, T.; Heuwieser, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* **2011**, *75*, 1311–1318. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.002>.
36. Kenney, R.M. DP. Equine Endometrial Biopsy. In *Current Therapy in Theriogenology*; Da, M., ed.; W.B Saunders Company: Philadelphia, PA, USA, 1986; pp. 723–729.
37. Schoon, H.-A.; Schoon, D.; Klug, E. Endometrial biopsies as an ancillary aid in diagnosis and prognosis of subfertility in the mare. *Pferdeheilkunde Equine Med.* **1992**, *8*, 355–362. <https://doi.org/10.21836/pem19920603>.
38. Franck, T.; Grulke, S.; Deby-Dupont, G.; Deby, C.; Duvivier, H.; Péters, F.; Serteyn, D. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific equine neutrophil myeloperoxidase measurement in blood. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2005**, *17*, 412–419.
39. Franck, T.; Kohnen, S.; Deby-Dupont, G.; Grulke, S.; Deby, C.; Serteyn, D. A Specific Method for Measurement of Equine Active Myeloperoxidase in Biological Samples and in Vitro Tests. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2006**, *18*, 326–334. <https://doi.org/10.1177/104063870601800402>.
40. Hoffmann, C.; Bazer, F.W.; Klug, J.; Aupperle, H.; Ellenberger, C.; Schoon, H.A. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. *Theriogenology* **2009**, *71*, 264–274.
41. Khalilova, I.S.; Dickerhof, N.; Mocatta, T.J.; Bhagra, C.J.; McClean, D.R.; Obinger, C.; Kettle, A.J. A myeloperoxidase precursor, pro-myeloperoxidase, is present in human plasma and elevated in cardiovascular disease patients. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192952>.
42. Kenney, R.; Doig, P. Equine endometrial biopsy. *Curr. Ther. Ther.* **1986**, *2*, 723–729.
43. Hoffmann, C.; Bazer, F.W.; Klug, J.; Aupperle, H.; Ellenberger, C.; Özgen, S.; Schoon, D.; Schoon, H.-A. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Reaction patterns in the cycling mare. *Pferdeheilkunde Equine Med.* **2009**, *25*, 212–219. <https://doi.org/10.21836/pem20090303>.
44. Schöniger, S.; Gräfe, H.; Richter, F.; Schoon, H.-A. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as transcript and protein in the healthy and diseased equine endometrium. *Res. Vet. Sci.* **2018**, *118*, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.03.001>.
45. Schöniger, S.; Gräfe, H.; Schoon, H.-A. Beta-defensin is a component of the endometrial immune defence in the mare. *Pferdeheilkunde Equine Med.* **2013**, *29*, 335–346. <https://doi.org/10.21836/pem20130307>.
46. Schöniger, S.; Böttcher, D.; Theußl, T.; Schoon, H.-A. Expression of Toll-like receptors 2, 4 and 6 in equine endometrial epithelial cells: A comparative in situ and in vitro study. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *112*, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.004>.
47. Churg, A.; Anderson, W.A. Induction of Endometrial Peroxidase Synthesis and Secretion by Estrogen and Estrogen Antagonist. *J. Cell Biol.* **1974**, *62*, 449–459.
48. McRae, A.C. The blood-uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids. *Reproduction* **1988**, *82*, 857–873. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820857>.
49. Ceusters, J.D.; Mouithys-Mickalad, A.A.; Franck, T.J.; Derochette, S.; Vanderplasschen, A.; Deby-Dupont, G.P.; Serteyn, D.A. Effect of myeloperoxidase and anoxia/reoxygenation on mitochondrial respiratory function of cultured primary equine skeletal myoblasts. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.12.004>.
50. de Araujo, T.H.; Okada, S.S.; Ghosn, E.E.; Taniwaki, N.N.; Rodrigues, M.R.; de Almeida, S.R.; Mortara, R.A.; Russo, M.; Campa, A.; Albu-querque, R.C. Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages. *Cell Immunol.* **2013**, *281*, 27–30.
51. Wira, C.R.; Grant-Tschudy, K.S.; Crane-Godreau, M.A. Epithelial Cells in the Female Reproductive Tract: A Central Role as Sentinels of Immune Protection. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2005**, *53*, 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00248.x>.
52. Kolm, G.; Klein, D.; Knapp, E.; Watanabe, K.; Walter, I. Lactoferrin expression in the horse endometrium: Relevance in persisting mating-induced endometritis. *Veter. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *114*, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.08.005>.
53. Katila, T.; Lock, T.; Hoffmann, W.; Smith, A. Lysozyme, alkaline phosphatase and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology* **1990**, *33*, 723–732. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(90\)90549-9](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90549-9).
54. Shibata, T.; Sakamoto, J.; Osaka, Y.; Neyatani, N.; Fujita, S.; Oka, Y.; Takagi, H.; Mori, H.; Fujita, H.; Tanaka, Y.; Sasagawa, T. Myeloperoxidase in blood neutrophils during normal and abnormal menstrual cycles in women of reproductive age. *Int. J. Lab. Hematol.* **2017**, *39*, 169–174.
55. Békési, G.; Kakucs, R.; Varbiro, S.; Feher, J.; Pazmany, T.; Magyar, Z.; Sprintz, D.; Szekacs, B. Induced myeloperoxidase activity and related superoxide inhibition during hormone replacement therapy. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2001**, *108*, 474–481.

56. Houdeau, E.; Larauche, M.; Monnerie, R.; Bueno, L.; Fioramonti, J. Uterine motor alterations and estrous cycle disturbances associated with colonic inflammation in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2005**, *288*, 630–637.
57. Baiza-Gutman, L.; Flores-Sánchez, M.; Diaz-Flores, M.; Hicks, J. Presence of uterine peroxidase activity in the rat early pregnancy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 255–262. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00061-8](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00061-8).
58. Cummings, A.M.; Metcalf, J.L. Mechanisms of the stimulation of rat uterine peroxidase activity by methoxychlor. *Reprod. Toxicol.* **1994**, *8*, 477–486. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90030-2).
59. Farley, D.B.; Ford, S.P.; Rosazza, J.P.N. Increase in uterine peroxidase activity in the rat uterus during oestrogen hyperaemia. *Reproduction* **1992**, *95*, 551–558. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950551>.
60. Okada, H.; Nawa, M.; Kimura, J. In Vitro Effect of Estrogens on the Peroxidase Activity of Human Endometrium*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1985**, *61*, 404–407. <https://doi.org/10.1210/jcem-61-3-404>.
61. Batra, S.C.; Iosif, C.S. Effect of Estrogen Treatment on the Peroxidase Activity and Estrogen Receptors in the Female Rabbit Urogenital Tissues. *J. Urol.* **1992**, *148*, 935–938. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)36781-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)36781-2).
62. Grant-Tschudy, K.S.; Wira, C.R. Effect of Estradiol on Mouse Uterine Epithelial Cell Transepithelial Resistance (TER). *Am. J. Reprod. Immunol.* **2004**, *52*, 252–262. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00218.x>.
63. Lewis, G.S. Role of ovarian progesterone and potential role of prostaglandin F2 α and prostaglandin E2 in modulating the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes. *J. Anim. Sci.* **2003**, *81*, 285–293. <https://doi.org/10.2527/2003.811285x>.
64. Watson, E.D.; Stokes, C.R.; Bourne, F.J. Influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovarioectomized mares. *J. Endocrinol.* **1987**, *112*, 443–448. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1120443>.
65. Chadwick, J.W.; Fine, N.; Khoury, W.; Tasevski, N.; Sun, C.; Boroumand, P.; Klip, A.; Glogauer, M. Tissue-specific murine neutrophil activation states in health and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *110*, 187–195. <https://doi.org/10.1002/jlb.4ab1020-248rr>.
66. Seals, R.C.; Wulster-Radcliffe, M.C.; Lewis, G.S. Modulation of the Uterine Response to Infectious Bacteria in Postpartum Ewes. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2002**, *47*, 57–63. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.1o062.x>.
67. Klebanoff, S.J. Iodination of Bacteria: A Bactericidal Mechanism. *J. Exp. Med.* **1967**, *126*, 1063–1078. <https://doi.org/10.1084/jem.126.6.1063>.
68. Davies, M.J.; Hawkins, C.L. The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2020**, *32*, 957–981. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8030>.
69. Kargapolova, Y.; Geißen, S.; Zheng, R.; Baldus, S.; Winkels, H.; Adam, M. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants* **2021**, *10*, 562. <https://doi.org/10.3390/antiox10040562>.
70. Reilas, T.; del Alamo, M.M.R.; Liepina, E.; Yeste, M.; Katila, T. Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination. *Theriogenology* **2016**, *85*, 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.053>.
71. Ricketts, S.W.; Alonso, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet. J.* **1991**, *23*, 189–192. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1991.tb02752.x>.
72. Bradley, P.P.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. Cellular and Extracellular Myeloperoxidase in Pyogenic Inflammation. *Blood* **1982**, *60*, 618–622.
73. Edwards, S.W.; Nurcombe, H.L.; A Hart, C. Oxidative inactivation of myeloperoxidase released from human neutrophils. *Biochem. J.* **1987**, *245*, 925–928. <https://doi.org/10.1042/bj2450925>.
74. King, C.C.; Jefferson, M.M.; Thomas, E.L. Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **1997**, *61*, 293–302. <https://doi.org/10.1002/jlb.61.3.293>.
75. Klebanoff, S.J. Effect of estrogens on the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Infect. Immun.* **1979**, *25*, 153–156. <https://doi.org/10.1128/iai.25.1.153-156.1979>.
76. Galijasevic, S.; Abdulhamid, I.; Abu-Soud, H.M. Melatonin Is a Potent Inhibitor for Myeloperoxidase. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2668–2677. <https://doi.org/10.1021/bi702016q>.
77. Galijasevic, S.; Abdulhamid, I.; Abu-Soud, H.M. Potential role of tryptophan and chloride in the inhibition of human myeloperoxidase. *Free Radic. Biol.* **2008**, *44*, 1570–1577.
78. Eklinke, A.; Nussbaum, C.; Kubala, L.; Friedrichs, K.; Rudolph, T.K.; Rudolph, V.; Paust, H.-J.; Schröder, C.; Benten, D.; Lau, D.; et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* **2011**, *117*, 1350–1358. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284513>.
79. Lefkowitz, D.L.; Gelderman, M.P.; Fuhrmann, S.R.; Graham, S.; Starnes, J.D.; Lefkowitz, S.S.; Bollen, A.; Moguilevsky, N. Neutrophilic Myeloperoxidase–Macrophage Interactions Perpetuate Chronic Inflammation Associated with Experimental Arthritis. *Clin. Immunol.* **1999**, *91*, 145–155.
80. Lefkowitz, D.L.; Roberts, E.; Grattendick, K.; Schwab, C.; Stuart, R.; Lincoln, J.; Allen, R.C.; Moguilevsky, N.; Bollen, A.; Lefkowitz, S.S. The Endothelium and Cytokine Secretion: The Role of Peroxidases as Immunoregulators. *Cell Immunol.* **2000**, *202*, 23–30.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Journal of Equine Veterinary Science 125 (2023) 104736



Journal of Equine Veterinary Science 125 (2023) 162
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104736>

Immunohistochemical expression of myeloperoxidase in the equine endometrium suffering from endometrosis

Sonia Parrilla Hernández^{1,*}, Fabrice Reigner², Émilie Feyereisen³, Carine Munaut³, Thierry Franck⁴, Stéfan Deleuze^{1,5}

¹Physiology of Reproduction, Veterinary Medicine Faculty, ULiège, Liège, Belgium

²INRAE, UMR1297 PAO, Nouzilly, France

³Laboratory of Tumor and Developmental Biology, GIGA-Cancer, ULiège, Liège, Belgium

⁴CORD, ULiège, Liège, Belgium

⁵Equine and Companion Animal Reproduction, Veterinary Medicine Faculty, ULiège, Liège, Belgium

Myeloperoxidase (MPO) is a pro-oxidant enzyme with potent bactericidal activity playing an important role in the innate immune response against microbial pathogens. MPO is a marker of neutrophil activation, but it is also expressed by epithelial cells. In the endometrium of mares in physiological conditions, MPO is immunohistochemically expressed in a hormonal-dependent fashion with maximal expression in mid and basal glands during estrus (Parrilla Hernández et al. *Animals*, 2023;13(3):375). This suggests that MPO, as a part of the uterine mucosal immune system, contributes to the prevention of equine endometrial contamination and inflammation. Thus, an alteration of the MPO expression may have an impact on uterine immune defense. A deviation in the endometrial expression pattern of some other proteins has already been associated with endometrosis (Hoffmann et al. *Theriogenology*, 2009;71:264-274) and it has been proposed as one of the reasons for the reduced fertility in mares suffering of this condition. Therefore, the aim of this study was to investigate the immunohistochemical expression pattern of MPO in the estrous equine endometrium affected by endometrosis. Endometrial biopsies (n=7) obtained from mares in estrus with histological detection of three or less neutrophils per field

(400x) and presenting a moderate endometrial fibrosis were studied. Immunohistochemical analysis using MPO-specific horse antibody was performed. The uterine glandular epithelium within fibrotic foci mostly presented a non-steroidal dependent immunostaining pattern reaction. In comparison to unaffected glands, most glandular epithelial cells surrounded by periglandular fibrosis exhibited no or decreased MPO immunostaining. No differences were observed between single glands or nests. These results are in accordance with previous studies for other endometrial expressed proteins. This decrease of MPO expression in the presence of periglandular fibrosis may be produced by a lack of paracrine communication between stromal and epithelial cells, which is necessary for the regulation of uterine secretory proteins by sex hormones (Pierron et al. *Biology of reproduction*, 2001;64(3):831-838). Although further investigation with different degrees of endometrosis is necessary, the reduced expression of MPO compared to that expected in estrus we observed in this study suggests that endometrosis may lead to disturbance in the uterine immune environment, which in turn may predispose to an increase of susceptibility to uterine infections and endometritis in mares.

Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège
4000 Liège (Belgique)

D/2025/0480/6
ISBN 978-2-87543-235-3



9 782875 432353

A standard 1D barcode is positioned vertically. Below the barcode, the numbers 9, 782875, and 432353 are printed, corresponding to the barcode's value.