

## Prévention des pertes de production et de qualité du lait par la modulation de la réponse inflammatoire lors d'une mammite

Durée : 09/1997 – 05/2001

### Résumé

La mammite est responsable de millions de dollars de pertes pour les producteurs de lait au Québec et ailleurs. La plus grande partie de ces pertes (environ 65 %) résulte de la baisse permanente de production laitière attribuable à des dommages irréversibles causés au tissu mammaire. Les conséquences néfastes observées suite à l'infection sont en bonne partie attribuables à une réponse inflammatoire excessive de la vache. La présence des bactéries provoque l'activation des cellules immunitaires de la glande mammaire qui constitue la défense de la vache. Les cellules activées relâchent alors une panoplie de médiateurs inflammatoires qui rendent possible la migration massive de cellules immunitaires du sang vers la glande mammaire. Plusieurs indices laissent croire que les radicaux libres et les protéases (enzymes digérant les protéines) libérés par les cellules immunitaires pourraient être impliqués dans la mammite et que leur excès affecte la fonction mammaire. Cependant, on ignore encore plusieurs détails au sujet des mécanismes responsables des dommages permanents à la glande mammaire. Grâce à une meilleure connaissance des mécanismes, nous pourrions arriver à contrôler la réponse inflammatoire et à réduire les conséquences néfastes à long terme sur la production laitière et la qualité du lait. Nous avons observé que la mammite entraîne la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) impliquant les cellules épithéliales mammaires et les macrophages. Le monoxyde d'azote est une molécule très instable qui réagit rapidement avec d'autres radicaux, tels les superoxydes, pour former des agents oxydants très toxiques. Nos études, afin de vérifier l'effet de l'inhibition de la synthèse de NO, ont montré un niveau de protection modéré contre les dommages au tissu mammaire. Récemment, nous avons observé qu'une substance naturelle bloquant l'action de plusieurs radicaux libres, la mélatonine, protège les cellules mammaires de l'action de neutrophiles activés en laboratoire. Nous travaillons actuellement à mettre au point un traitement permettant de réduire la production de radicaux libres dans le pis. Ce projet a également mis en évidence la présence de protéases dans le lait mammitieux. Certaines de ces enzymes s'attaquent non seulement aux protéines du lait, mais aussi aux protéines de la glande mammaire. Une famille d'enzymes, les métalloprotéinases (MMP), semble contribuer de façon importante à la dégradation des protéines du lait et à la destruction des tissus. Un meilleur contrôle de l'inflammation et de la protéolyse contribuera à accélérer la convalescence de la vache et à prévenir les pertes de production et de la qualité du lait lors de mammites.

### Objectifs et méthodologie

Même dans les meilleures conditions, il est hautement improbable de voir un jour apparaître des troupeaux exempts de mammite. Notre objectif est d'accélérer la convalescence des vaches atteintes et de réduire les conséquences néfastes à long terme sur la production laitière. Ce programme vise, plus précisément, à comprendre de quelle façon l'inflammation induit des dommages à la glande mammaire et à identifier des moyens de les prévenir.

#### Objectifs spécifiques :

- 1) Déterminer la chronologie de l'induction de la synthèse du monoxyde d'azote et des protéases lors d'une mammite et leur relation avec l'augmentation du nombre de cellules somatiques du lait.
- 2) Mesurer l'impact de la modulation de la synthèse endogène du monoxyde d'azote lors d'une réponse inflammatoire aux endotoxines.
- 3) Déterminer le rôle de médiateurs inflammatoires endogènes dans la fonctionnalité des leucocytes.
- 4) Déterminer les facteurs influençant la synthèse de monoxyde d'azote par les cellules immunitaires de la glande mammaire.
- 5) Identifier des substances permettant de réduire le dommage cellulaire induit par des facteurs relâchés par des neutrophiles activés.

- 6) Caractériser les enzymes protéolytiques du lait mammitieux et de démontrer leurs effets sur le lait et les tissus mammaires sains.

Afin d'étudier la réponse inflammatoire de la vache, on utilise le modèle de la mammite aux endotoxines *i.e.* on fait croire à la vache que son pis est infecté et qu'elle doit le défendre. Pour ce faire, on infuse dans le pis des endotoxines provenant de la bactérie *Escherichia coli*. Les endotoxines sont accompagnées ou non de substances interférant avec la synthèse de monoxyde d'azote ou d'autres radicaux libres. Nous utilisons aussi des techniques de culture cellulaire permettant d'étudier le rôle du monoxyde d'azote et de médiateurs inflammatoires sur la fonctionnalité des cellules immunitaires. Récemment, nous avons mis au point un système de co-culture permettant d'étudier le potentiel protecteur de molécules sur la survie des cellules mammaires pour, par la suite, les tester chez la vache. Nous avons adapté et utilisé une technique (zymogramme) qui permet de mesurer la présence de protéases dans le lait. Grâce à cette méthode, nous pouvons déceler les protéases très tôt lors de la réponse inflammatoire. D'autres techniques permettent de mesurer les effets des protéases sur la dégradation et la coagulation des protéines du lait et sur la destruction du tissu mammaire.

## Résultats et perspectives

Nous avons observé, lors d'expériences antérieures, que l'injection d'endotoxines bactériennes provoque les symptômes classiques d'une mammite à *E. coli* (fièvre, altération de la composition et de l'apparence du lait, etc.). Nous avons observé lors d'une mammite induite aux endotoxines que la progression de l'inflammation mammaire coïncide avec une production élevée de NO. De plus, les cellules somatiques isolées de quartiers inflammés relâchent une quantité importante de NO en culture. Lors d'expériences *in vitro*, nous avons déterminé que les monocytes/macrophages et les cellules épithéliales mammaires sont parmi les cellules responsables de ce relâchement de NO. Néanmoins, l'infusion d'un donneur de NO (molécule instable qui, en solution aqueuse, se décompose et relâche du NO) n'a induit qu'une faible réponse inflammatoire. Nous croyons que l'absence de superoxyde, un autre radical libre produit par les neutrophiles activés, n'a pas permis la formation de peroxyde, une molécule qui semble responsable de la plupart des effets toxiques du NO. Nous avons observé une réduction modérée des symptômes de l'inflammation par l'inhibition de la synthèse de NO. De plus, la présence de molécules inhibant le NO ne semble pas avoir d'effets négatifs sur la capacité des neutrophiles activés à relâcher des anions superoxyde (molécules servant à tuer les bactéries). Néanmoins, une stratégie plus large est nécessaire pour protéger efficacement le tissu mammaire. Nous vérifions actuellement le niveau de protection que procurent différentes molécules contre les dommages causés aux cellules épithéliales mammaires par des neutrophiles activés dans un

système de co-culture. Ce modèle nous a permis d'identifier deux substances antioxydantes très prometteuses, la mélatonine et la catalase, qui diminuent l'effet cytotoxique des neutrophiles activés. Nous vérifions actuellement le niveau de protection que procure la mélatonine sur la réponse inflammatoire, le dommage cellulaire et la production laitière lors d'une mammite aux endotoxines.

Les zymogrammes de lait mammitieux ont montré plusieurs zones ou bandes de protéolyse. Lors d'une mammite, les protéases augmentent très rapidement, en intensité et en nombre. Nous avons démontré que ces protéases peuvent hydrolyser les protéines du lait ainsi que la matrice extracellulaire. L'une d'elles est la plasmine, déjà reconnue pour détruire les caséines. Cependant, plusieurs autres bandes possèdent des caractéristiques des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire. La comparaison des activités protéolytiques du lait mammitieux, du sang, des cellules somatiques et des neutrophiles a permis d'établir que l'activité protéolytique du lait mammitieux provient des cellules somatiques. Sachant que les neutrophiles contribuent pour 90 % des cellules somatiques lors d'une mammite, nous croyons que l'élastase, la gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9) sont des enzymes impliqués dans l'activité protéolytique du lait. Grâce à des études d'inhibition, nous pouvons affirmer que des enzymes de types sérine-, cystéine-, métalloprotéinase sont impliquées lors d'une mammite. Ces résultats permettent d'orienter nos recherches vers l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques pour contrecarrer l'effet des protéases.

## Transfert des résultats

Les résultats ont permis la publication d'un article scientifique et la soumission de trois autres, dont un est accepté. Huit présentations ont été faites lors de congrès scientifiques. Un mémoire de maîtrise a également été déposé. Il est également possible que certains résultats

fassent l'objet d'une demande de brevet. L'exploitation de la propriété intellectuelle pourrait se faire via la création d'une entreprise à laquelle les partenaires financiers du projet seraient invités à s'associer.

## Partenaires financiers

Agriculture et Agroalimentaire Canada  
Les Producteurs laitiers du Canada  
Novalait inc.

Budget total : 374 760 \$

## Point de contact

Responsable du projet :

**Pierre Lacasse**, Ph. D.

Agriculture et Agroalimentaire Canada

Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc (CRDBLP)

2000, Route 108 Est, C.P. 90

Lennoxville (Québec) J1M 1Z3.

Téléphone : (819) 565-9171

Télécopieur : (819) 564-5507

Courriel : LacasseP@em.agr.ca

Collaborateurs :

**Denis Petitclerc**, Ph. D., **Catherine Desrosiers**, M. Sc. et

**Véronique Boulanger**, M. Sc., AAC – CRDBLP

**Xin Zhao Ph. D.**, Département de sciences animales, Université McGill

**D'Yvon Couture**, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.