

Prévention des dommages à l'épithélium mammaire par la modulation de la réponse inflammatoire lors d'une mammites

Durée : 06/2001 – 09/2003

Résumé

La mammites se manifeste par une inflammation de la glande mammaire et apparaît, le plus souvent, en réponse à une infection d'origine bactérienne. Il est bien établi que la perte de production laitière découlant d'une mammites est attribuable à des dommages irréversibles causés au tissu mammaire par la réponse inflammatoire. Ceci est particulièrement vrai pour les infections causées par des bactéries de type gram-négatif, où il y a souvent perte du quartier atteint. Les conséquences néfastes observées lors de ce type d'infection sont en bonne partie attribuables à une réponse inflammatoire excessive de la vache. La migration massive des neutrophiles au site d'infection est impérative à la défense naturelle de la vache contre les pathogènes. Les bactéries phagocytées par les neutrophiles sont éliminées par l'action de protéases (enzymes digérant les protéines) et de réactifs oxygénés. Plusieurs raisons laissent croire que ces substances toxiques destinées à tuer les bactéries seraient aussi libérées dans le lait et endommageraient les cellules mammaires avoisinantes, réduisant leur activité sécrétrice. L'inflammation qui est d'abord un mécanisme naturel de défense, va, dans ce cas, contribuer aussi au problème en causant des dommages irréversibles au tissu mammaire, entraînant une diminution de la production laitière. Dans un premier temps, nous avons testé un nombre important de substances pouvant potentiellement protéger la glande mammaire en laboratoire. Les quatre substances les plus prometteuses ont ensuite été mises à l'épreuve à l'aide d'un modèle de mammites induite par des endotoxines. L'une de ces substances s'est avérée particulièrement efficace et son effet protecteur a ensuite été confirmé chez des vaches infectées avec la bactérie *Escherichia coli*. Ces résultats permettent d'envisager le développement d'un nouveau traitement.

Objectifs et méthodologie

Même dans les meilleures conditions, il est hautement improbable de voir un jour apparaître des troupeaux exempts de mammites. Notre objectif à long terme est de développer un traitement permettant de diminuer les dommages mammaires causés par les mécanismes naturels de défense induits lors d'une infection, et donc, réduire les conséquences néfastes à long terme sur la production laitière et la qualité du lait. Dans le cadre de ce projet, nous avons franchi les étapes suivantes :

- déterminer les mécanismes d'induction du dommage cellulaire et sélectionner des inhibiteurs ou « scavenger » de protéases et/ou réactifs oxygénés à l'aide d'un modèle *in vitro*;
- étudier l'effet des inhibiteurs présélectionnés sur la réponse inflammatoire, le dommage cellulaire et la production laitière lors d'une mammites causée par des endotoxines;
- déterminer l'effet de l'inhibiteur le plus efficace sur la réponse inflammatoire, le dommage cellulaire et la production laitière lors d'une mammites aiguë.

Nous avons utilisé un modèle *in vitro* nous permettant d'étudier le potentiel protecteur de molécules, notamment des antioxydants, sur la survie des

cellules de l'épithélium mammaire. Ce modèle est composé de neutrophiles sanguins activés et d'une lignée de cellules épithéliales bovines transformées (cellules MAC-T). L'incubation de cellules MAC-T avec des neutrophiles activés permet d'induire un dommage cellulaire dont l'ampleur est évalué par la quantité de lactate déshydrogénase, une enzyme relâchée dans le milieu de culture. La cytotoxicité est mesurée en présence de différents antioxydants (catalase, mélatonine, vitamines E et C, 2-méthoxyestradiol, catéchine, etc.) et d'inhibiteurs de protéases (aprotinine, phénanthroline, etc.). Ce modèle est un atout majeur dans la sélection de molécules candidates.

Afin d'étudier la réponse inflammatoire de la vache, nous avons d'abord utilisé le modèle de mammites induite par des endotoxines qui simule une infection mammaire et déclenche chez la vache une réponse inflammatoire. Pour ce faire, on infuse, dans le pis, des endotoxines provenant de la bactérie *Escherichia coli*. Les endotoxines sont accompagnées ou non de substances inhibitrices.

La substance antioxydante la plus intéressante sélectionnée à l'issue des expériences précédentes a ensuite été testée chez des vaches infectées par la bactérie *Escherichia coli*.

Résultats et applications

Le modèle *in vitro* nous a permis d'identifier plusieurs substances naturelles prometteuses. Une de ces substances fera l'objet d'une demande de brevet et sera donc identifiée SUBX. Dans le modèle *in vitro*, l'addition de mélatonine, de catalase, de catéchine, de glutathione éthyl ester (GSE) ou de SUBX aux neutrophiles activés a augmenté de façon spectaculaire la viabilité des cellules épithéliales mammaires. La mélatonine est impliquée dans divers processus physiologiques et possède des propriétés antiradicalaires et antioxydantes. Étant à la fois lipo- et hydrosoluble, elle peut avoir un effet protecteur sur les lipides membranaires et dans l'environnement extracellulaire. La catalase est une enzyme qui convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène diminuant ainsi le relâchement de radical hydroxyl qui possède un important pouvoir oxydatif. La SUBX est une substance produite par certains microorganismes. Elle se lie à un catalyseur précis impliqué dans plusieurs réactions oxydo-réductrices générant des radicaux libres. Les réactions oxydo-réductrices ne pouvant plus se produire, moins de radicaux libres sont alors générés. Le GSE augmente l'efficacité d'une enzyme déjà présente dans la cellule, soit la glutathione peroxydase (GPx). Celle-ci élimine le peroxyde d'hydrogène en le transformant en eau. Quant à la catéchine, elle est un antioxydant d'origine végétal pouvant neutraliser certains radicaux oxygénés.

Transfert des résultats

Les résultats feront l'objet d'une thèse de maîtrise et d'au moins un article scientifique dans l'année en cours. Une demande de brevet est également en voie d'être complétée.

Partenaires financiers

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies
Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
Novalait inc.

BUDGET TOTAL : 100 000 \$

Nous avons d'abord testé l'effet de la mélatonine chez la vache. Malheureusement, l'infusion de mélatonine n'a pas eu d'effet significatif sur la réponse inflammatoire lors d'une mammite induite par des endotoxines. Nous avons donc sélectionné trois nouvelles substances (catéchine, GSE, SUBX) préalablement validées dans notre modèle *in vitro* afin d'évaluer leur effet chez la vache lors d'une mammite induite par des endotoxines. Les résultats ont démontré que ni la catéchine, ni le GSE ont un effet protecteur. Toutefois, la SUBX a démontré un potentiel de protection significatif. En effet, les niveaux de LDH et de NAGase (deux marqueurs de dommages cellulaires) retrouvés dans le lait ont été significativement plus bas dans les quartiers traités avec endotoxines et SUBX comparés aux quartiers traités aux endotoxines seulement. Le potentiel protecteur de SUBX a ensuite été évalué chez la vache lors d'une mammite causée par *Escherichia coli*. Les résultats obtenus sont venus confirmer ceux précédemment observés : SUBX semble protéger les cellules mammaires contre l'attaque des réactifs oxygénés.

Point de contact

Responsable du projet : Xin Zhao, Ph.D.

Université McGill
Département des sciences animales
21 111, chemin Lakeshore
Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec) H9X 3V9
Téléphone : (514) 398-7975
Télécopieur : (514) 398-7964
Courriel : zhao@macdonald.mcgill.ca

Collaborateurs :

Arif F. Mustafa, Ph.D., chercheur, Université McGill, Département de sciences animales

Pierre Lacasse, Ph.D., chercheur, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de Recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc

Benoît Paquette, Ph.D., chercheur, Université de Sherbrooke, Département de médecine nucléaire et radiologie



FONDS DE DÉVELOPPEMENT DE L'INDUSTRIE
LAITIÈRE DU QUÉBEC
NOVALAIT INC.

2750, rue Einstein, bureau 220-A
Sainte-Foy (Québec) G1P 4R1

Téléphone : (418) 527-7947
Télécopieur : (418) 527-5957
Courriel : novalait@novalait.ca