

# IMPACT DE L'AMMONIAC SUR LE SYSTÈME RESPIRATOIRE DU PORC

## Analyse de la relation dose-effet

*P. GUSTIN, B. URBAIN, J.F. PROUVOST, M. ANSAY*

*Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pharmacologie et de Toxicologie  
Boulevard de Colonster, B 41, B 4000, Liège-Belgique*

L'ammoniac est un gaz souvent présent dans les locaux d'élevage et de production animale à des concentrations pouvant donner lieu à des effets toxiques. D'abord absorbé par les voies respiratoires supérieures, il peut néanmoins atteindre les poumons directement ou par l'intermédiaire de particules en suspension dans l'air. Les objectifs des recherches présentées dans ce travail sont d'étudier les effets de l'ammoniac sur le système respiratoire du porc de manière quantitative afin d'être en mesure de proposer des concentrations non toxiques pouvant être utilisées pour l'établissement de normes de pollution dans les porcheries. Des concentrations de 25 ppm peuvent induire chez des animaux exposés pendant 6 jours une inflammation nasale, une hyper-réactivité trachéale et une réduction de la croissance corporelle. Des effets délétères ont été enregistrés au niveau pulmonaire à partir de 50 ppm. L'ammoniac est donc un gaz capable d'induire, à de faibles concentrations, des effets toxiques susceptibles d'augmenter la sensibilité des animaux aux maladies respiratoires.

### **Effects of ammonia on the respiratory system in pigs : study of the dose-response curve.**

Ammonia is often detected in animal houses at concentrations which can induce toxic effects. At first, this gas is absorbed at the level of the upper airways but can also reach the lungs directly or after absorption on particles. The purpose of our researchs is to study quantitatively the effects of ammonia on the respiratory system in pigs in order to propose a no effect level which can be used to suggest acceptable level of pollution in pig buildings. 25ppm of ammonia induce a nasal inflammation, a tracheal hyper-reactivity and an inhibition of the somatic growth in animals exposed for 6 days. Noxious effects at the pulmonary level are also observed at concentration greater than 50 ppm. Ammonia is a pollutant which can induce moderate toxic effects susceptible to increase the sensitivity to respiratory diseases at rather low concentrations.

## INTRODUCTION

L'ammoniac est un gaz présent dans toutes les porcheries à des concentrations très variables. Dans les locaux bien ventilés, les teneurs moyennes enregistrées sont inférieures à 10 ppm. En revanche, elles sont comprises entre 25 et 50 ppm et peuvent même atteindre des pics de 100 ppm dans les exploitations mal gérées sur le plan hygiénique. L'étude de la toxicité de l'ammoniac, qui a récemment fait l'objet d'un article de synthèse (GUSTIN et al, 1991), fait apparaître un grand nombre de lacunes, voire des contradictions. Leur origine est en partie expliquée par le fait que la plupart des méthodes utilisées pour détecter les effets de l'ammoniac sont qualitatives. L'interprétation des résultats est souvent subjective du fait de l'absence de relation dose-effet. Cette dernière est le fondement de toutes propositions en matière de niveau de pollution acceptable dans les porcheries.

Au cours de nos recherches, nous avons tenu compte de ces éléments et tenté de combler ces lacunes en développant des techniques adaptées à l'analyse quantitative des effets directs de l'ammoniac sur le système respiratoire. En outre, l'hypothèse d'une interaction entre ce gaz et les agents biologiques a également été envisagée. L'objet du présent article est de présenter de manière synthétique les données essentielles obtenues au cours de nos travaux. Les effets biologiques de l'ammoniac sur les divers segments du tractus respiratoire du porc sont détaillés en insistant particulièrement sur la relation dose-effet. Parallèlement, l'impact zootechnique du gaz est également abordé.

### 1. IMPACT ZOOTECHNIQUE ET TOXICITÉ DE L'AMMONIAC POUR LES VOIES RESPIRATOIRES

Les cavités naso-pharyngées et la trachée sont les premiers segments du tractus respiratoire en contact avec les polluants atmosphériques. Tout agent irritant devrait par conséquent y exercer sa pathogénicité avec une intensité dépendante de divers facteurs comme la solubilité dans l'eau des gaz ou la

dimension et la forme des particules. L'ammoniac, piégé par les cavités nasales, provoque, chez le porcelet, une irritation nasale et oculaire (DOIG et WILLOUGHBY, 1971). Une inflammation des voies respiratoires extra-thoraciques accompagnée d'une hyperplasie épithéliale a été observée à partir de 50 ppm après 4 semaines d'exposition (DRUMMOND et al, 1980). Nos objectifs étaient d'analyser de manière quantitative le pouvoir irritant de l'ammoniac vis-à-vis des muqueuses nasales et son influence sur la réactivité du muscle trachéal. L'impact de l'ammoniac sur les performances zootechniques des animaux est également envisagée. Ces divers aspects sont successivement abordés dans les chapitres qui suivent.

#### 1.1. Impact zootechnique de l'ammoniac et analyse de son pouvoir irritant au niveau des cavités nasales

Les travaux consacrés à l'étude de la toxicité de l'ammoniac au niveau des cavités nasales sont, jusqu'à ce jour, limités à des descriptions qualitatives des lésions macroscopiques et histologiques. Nous nous sommes dès lors proposés d'aborder ce sujet en appliquant au porc la méthode du lavage nasal jusqu'ici réservée à l'homme et au chien (GUSTIN et al, 1993 a). La technique du lavage nasal, simple et non-invasive, repose sur le dosage de divers éléments comme l'albumine et les protéines ainsi que sur l'identification et la numération des cellules dans le liquide de rinçage des cavités nasales. Les variations de ces paramètres en réponse à un polluant sont le reflet de la réaction inflammatoire au niveau des muqueuses.

Des porcelets pesant en moyenne 26,4 kg ont été exposés, pour une durée de 6 jours dans un isolateur, à l'une des quatre concentrations en ammoniac suivantes dans des conditions standardisées : 0,25, 50 et 100 ppm (URBAIN et al, 1993). La concentration en albumine et une numération leucocytaire ont été pratiquées dans le liquide de lavage nasal récolté au début et à la fin de l'exposition. Le poids corporel des animaux a été mesuré au début et à la fin des expositions afin d'évaluer les effets de l'ammoniac sur la croissance.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1.

**Tableau 1** - Concentration en albumine et nombre de leucocytes (PMN) dans le liquide de lavage récolté au début (Pre) et à la fin (post) de la période d'exposition ( $X \pm SE$ )

Concentration Ammoniac (ppm)	PMN $\times 10^3$ /ml		Albumine (ng/ml)	
	Pre	Post	Pre	Post
<b>Contrôle</b> (n=7)	63,1 $\pm$ 32,8	57,9 $\pm$ 28,4	681 $\pm$ 202	639 $\pm$ 184
<b>25 ppm</b> (n=6)	49,3 $\pm$ 23,6	190,2 $\pm$ 55,4 $\Delta$	702 $\pm$ 124	765 $\pm$ 166
<b>50 ppm</b> (n=7)	56,8 $\pm$ 17,2	232,2 $\pm$ 76,3 $\Delta$	646 $\pm$ 130	1,549 $\pm$ 448
<b>100 ppm</b> (n=7)	69,2 $\pm$ 22,5	394,1 $\pm$ 109,7 $^*\Delta$	756 $\pm$ 234	1,913 $\pm$ 539 $^*\Delta$

\* valeur significativement différente de celle mesurée avant l'exposition ( $p < 0.05$ )

$\Delta$  valeur significativement différente du contrôle ( $p < 0.05$ )

L'exposition des animaux à 100 ppm induit une inflammation de la muqueuse comme le montre l'augmentation significative de la concentration en albumine et du nombre de leucocytes. L'intensité des changements est liée à la concentration en ammoniac. L'équation de la régression linéaire établie entre le nombre des leucocytes comptés par millilitres de liquide de lavage (PMN.  $10^3/\text{ml}$ ) au 6<sup>ème</sup> jour et la concentration en ammoniac est :

$$\text{PMN} \cdot 10^3/\text{ml} = 74,790 + 3,181 [\text{NH}_3] \quad r = 0,98 \quad (p < 0,013)$$

À 25 ppm, des effets significatifs sont encore observés. Le «no effect level» est donc inférieur à cette concentration.

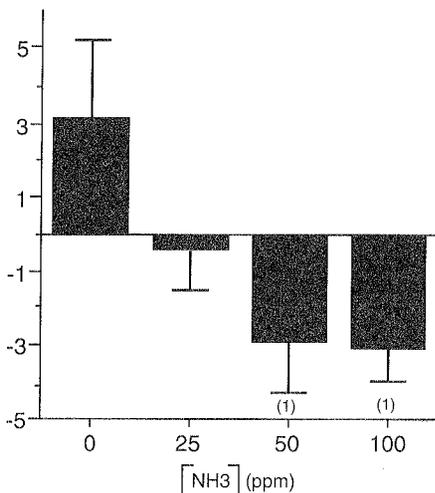
Une inhibition de la croissance des animaux dépendante de la concentration en ammoniac a été constatée (figure 1). L'équation liant la valeur du poids corporel mesurée à la fin de l'exposition, exprimée en % du poids corporel de départ, en fonction de la concentration en ammoniac est la suivante :

$$y = 3,2045 - 0,1777 [\text{NH}_3] + 0,0011 [\text{NH}_3]^2 \quad r = 0,987 \quad (p < 0,013)$$

Les conclusions suivantes peuvent être tirées sur la base des résultats présentés :

- (1) l'analyse biochimique et cytologique du liquide de lavage nasal chez le porc est une méthode adaptée à l'étude des effets des polluants atmosphériques;
- (2) l'exposition des animaux à l'ammoniac (0 - 100 ppm) pendant 6 jours induit une inflammation modérée des cavités nasales susceptible de favoriser l'envahissement des segments plus profonds du tractus respiratoire par des agents biologiques;
- (3) les résultats présentés permettent de proposer un «no effect level» inférieur à 25 ppm;
- (4) l'ammoniac ralentit la croissance des animaux. Cet effet, dépendant de la dose se manifeste à partir de 25 ppm. Le «no effect level» est inférieur à cette concentration.

**Figure 1** - Changements du poids corporel ( $\Delta P$ ), exprimé en % de la valeur de base, au cours de la période d'exposition à l'ammoniac



- (1) Différence significative par rapport au groupe témoin (0 ppm) ( $p > 0,05$ )

## 1.2. Réactivité du muscle trachéal chez des porcs exposés à l'ammoniac

Dans le cadre de la toxicité de l'ammoniac pour les voies aériennes supérieures, la question de l'évolution de la réactivité du muscle trachéal de porcs exposés à ce gaz est pertinente. L'effet de «trapping» joué par ce segment du tractus respiratoire du fait de la grande solubilité de l'ammoniac dans l'eau a déjà été souligné. Deux raisons pourraient, a priori, justifier l'apparition d'une hyper-réactivité du muscle lisse trachéal suite à l'exposition des animaux à l'ammoniac. L'épithélium trachéal, altéré par le polluant, pourrait perdre son rôle modulateur vis-à-vis des neurotransmetteurs et des médiateurs de l'inflammation. Le processus inflammatoire qui pourrait résulter de l'imprégnation des muqueuses par l'ammoniac est également une cause connue d'hyper-réactivité. Pour vérifier ces hypothèses, des animaux ont été euthanasiés après une exposition de 6 jours à une des 4 concentrations en ammoniac suivantes : 0, 25, 50 et 100 ppm. Un fragment du muscle trachéal a ensuite été prélevé et placé dans un bain d'organe permettant la mesure de la contractibilité musculaire. La réponse au carbachol et à l'isoprénaline a été mesurée en construisant des courbes dose-réponse. L'effet relaxant de l'isoprénaline a été étudié sur des fragments préalablement contractés à l'acétylcholine. Pour chacune de ces substances, l'effet maximum (Emax) (réactivité) et le logarithme négatif de la concentration molaire de l'agoniste produisant 50 % de Emax (pD2) (sensibilité) ont été calculés. L'influence de l'épithélium sur les contractions induites par le carbachol a également été testée en détruisant mécaniquement cette structure. Les résultats obtenus avec ce type de fragments sont notés E-.

Le carbachol est un agoniste puissant et efficace vis-à-vis du muscle trachéal du porc. L'augmentation significative de la réponse induite par la destruction de l'épithélium montre le rôle modulateur de cette structure vis-à-vis des contractions du muscle lisse (tableau 2). L'exposition des animaux à l'ammoniac (100 ppm) a pour conséquence d'augmenter la réponse maximale induite par le carbachol et de supprimer l'effet modulateur exercé par l'épithélium sur le muscle lisse. Chez les animaux exposés à 50 et à 25 ppm, l'augmentation de Emax n'est plus significative, mais le grattage de l'épithélium n'amplifie pas la réponse au carbachol prouvant ainsi la perte de son rôle modulateur. La réponse contractile des fragments pourvus de l'épithélium est fortement corrélée avec la concentration en ammoniac ainsi que l'illustre l'équation suivante :

$$\text{Emax (g/mg)} = 0,0013 \cdot [\text{NH}_3] + 0,2054 \quad r = 0,99 \quad (p < 0,006)$$

Aucune influence de l'ammoniac sur le pouvoir relaxant de l'isoprénaline n'a pu être mise en évidence.

L'augmentation significative de l'effet maximum (Emax) induit par le carbachol chez les porcs soumis à l'ammoniac prouve qu'une hyper-réactivité musculaire s'installe rapidement sous l'action de concentrations relativement modérées. L'accroissement de Emax induit par le grattage de l'épithélium chez les porcs témoins et l'absence de ce phénomène chez les animaux exposés à l'ammoniac suggère que, chez ces derniers, cette structure n'assume plus sa fonction modulatrice des contractions du muscle trachéal. Ce rôle régulateur a été identifié chez de nombreuses espèces (LAITINEN et al, 1985). L'infiltration leucocytaire de la muqueuse, pourrait également intervenir. Enfin, le «no effect level» relatif à la contractibilité du muscle trachéal des porcs exposés à l'ammoniac est inférieur à 25 ppm.

**Tableau 2** - Effet de l'exposition des porcs à l'ammoniac sur la sensibilité (pD<sup>2</sup>) et la réactivité (E<sub>max</sub>) du muscle trachéal au carbacol en présence (E<sup>+</sup>) et en absence (E<sup>-</sup>) de l'épithélium

		Concentration en ammoniac (ppm)			
		0	25	50	100
E max (g/mg)	E <sup>+</sup>	0,205 ± 0,025 (n=6)	0,244 ± 0,044 (n=6)	0,262 ± 0,024 (n=10)	0,338 ± 0,034 <sup>ΔΔ</sup>
	E <sup>-</sup>	0,273 ± 0,038 <sup>*</sup> (n=8)	0,239 ± 0,049 (n=6)	0,191 ± 0,015 <sup>Δ</sup> (n=6)	0,298 ± 0,058 (n=10)
pD <sub>2</sub>	E <sup>+</sup>	5,794 ± 0,129 (n=8)	5,735 ± 0,179 (n=6)	5,678 ± 0,382 (n=6)	5,864 ± 0,137 (n=10)
	E <sup>-</sup>	5,714 ± 0,178 (n=8)	5,718 ± 0,166 (n=6)	5,668 ± 0,391 (n=6)	5,750 ± 0,114 (n=10)

Δ : valeur significativement différente de celle enregistrée dans le groupe contrôle (0 ppm) (p < 0,05)

\* : valeur significativement différente de celle mesurée sur un lambeau avec épithélium (p < 0,05)

## 2. INTERACTION ENTRE L'AMMONIAC ET LES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES AU NIVEAU PULMONAIRE

Classiquement, les doses d'ammoniac susceptibles d'atteindre les poumons sont jugées trop faibles pour y développer un effet. Néanmoins, l'absence de toxicité pour le parenchyme pulmonaire reste à prouver chez la plupart des espèces. Des poulets soumis à 75 ppm d'ammoniac pendant 4 jours ont développé des altérations morphologiques du parenchyme pulmonaire (AL MASHADANI et BECK, 1985). Chez le porc, la proportion du gaz inhalé captée par les voies respiratoires extra-thoraciques est inconnue. Les foyers d'inflammation observés par DRUMMOND et al. (1981 a et b) chez des animaux ayant respiré de 50 à 100 ppm pendant 4 semaines sont difficilement attribuables à l'action directe de l'ammoniac. Toutefois, il faut aussi tenir compte de l'interaction possible entre l'ammoniac et les agents biologiques au niveau pulmonaire. Ainsi, les lésions de broncho-pneumonies induites par *Bordetella bronchiseptica* étaient plus graves chez les goretts vivant en atmosphère polluée que chez ceux respirant un air sain (DRUMMOND et al,

1981 a et b). Ces interactions restent encore inexpliquées.

L'objectif de cette étude était de détecter les effets directs de l'ammoniac pour le tissu pulmonaire du porcelet en recherchant, *in vitro*, les changements éventuels de l'hémodynamique micro-vasculaire induits par l'exposition des animaux à l'ammoniac pendant 6 jours. En outre, l'interaction entre l'ammoniac et les effets provoqués par les endotoxines de *E. Coli* sur les paramètres hémodynamiques a également été recherchée. Le protocole expérimental suivant a été respecté. Tous les animaux ont été exposés dans un isolateur pendant 6 jours à l'une des trois concentrations en ammoniac suivantes : 0, 50 et 100 ppm. Après ce séjour dans l'enceinte, tous les animaux ont été euthanasiés. Les poumons ont ensuite été perfusés et ventilés *in vitro* immédiatement après l'extraction du bloc cardio-pulmonaire et soumis à l'action des endotoxines injectées dans le liquide de perfusion. Les propriétés hémodynamiques des poumons ont été enregistrées au cours de cette période (GUSTIN et al., 1992; GUSTIN et al., 1993 b; URBAIN et al., 1992). Quatre groupes ont été constitués ainsi que l'illustre le tableau 3.

**Tableau 3** - Descriptions des traitements expérimentaux dans les différents groupes

Groupe	Traitements	
	Concentration en ammoniac dans l'isolateur durant 6 jours	Administration d'endotoxines <i>in vitro</i>
Groupe I (n=9)	0 ppm	-
Groupe II (n=23)	0 ppm	+
Groupe IV (n=7)	50 ppm	+
Groupe V (n=8)	100 ppm	+

La figure 2 illustre les effets directs des endotoxines sur la résistance vasculaire totale (Rt) des poumons. Les valeurs de base de tous les paramètres mesurés au cours de cette étude n'ont pas été influencées par le séjour des animaux dans une atmosphère enrichie en ammoniac. Dans le groupe II, non exposé à l'ammoniac, on constate une élévation progressive de Rt. Chez les porcs soumis à 100 ppm, une inhibition totale de la réponse hémodynamique aux endotoxines a été observée (groupe V). Cette interaction entre l'ammoniac et la réponse vasculaire pulmonaire aux endotoxines n'a pas été reproduite dans le groupe soumis à 50 ppm (groupe IV).

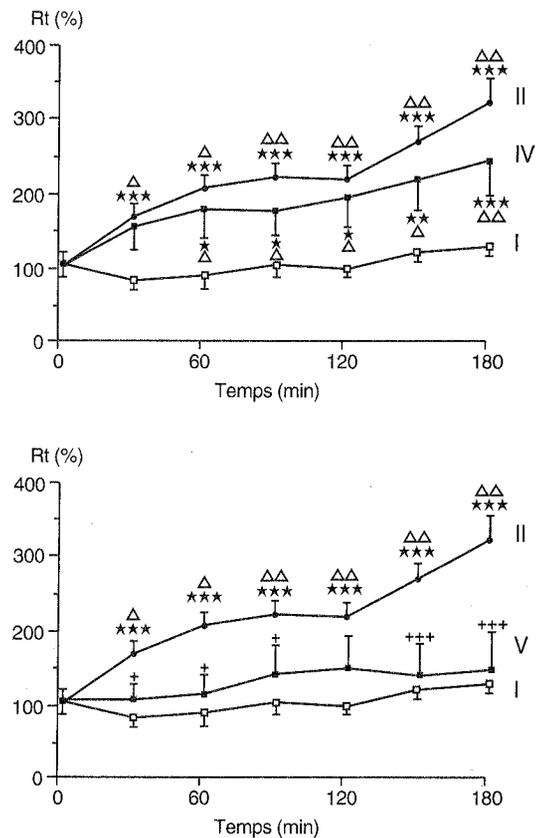
L'ensemble de ces résultats montrent que l'ammoniac inhalé par des porcs à des concentrations comprises entre 0 et 100 ppm n'influence pas directement l'hémodynamique microvasculaire. La conclusion d'une absence de toxicité de l'ammoniac au niveau pulmonaire serait néanmoins hâtive. À la concentration de 100 ppm, l'ammoniac interfère avec le déroulement de la réaction inflammatoire pulmonaire induite par les endotoxines en bloquant la réaction hypertensive par un mécanisme non élucidé. Cet effet pourrait aggraver le déroulement des pneumopathies du fait de l'absence de vasomotricité pulmonaire nécessaire au maintien d'un bon rapport entre la ventilation et la perfusion. Le «no effect level» proposé pour cet effet interactif au niveau du lit vasculaire pulmonaire est de 50 ppm.

### 3. CONCLUSIONS

D'une manière générale, on constate que (1) les modifications biologiques induites par l'ammoniac sont fortement corrélées avec les concentrations présentes dans l'enceinte, (2) il s'agit d'altérations modérées, on pourrait dire «sournoises», pouvant contribuer à accroître la sensibilité des animaux aux agents biologiques. Pour chaque effet biologique observé, les «no effect levels» suivants peuvent être proposés lorsque la durée d'exposition est de 6 jours :

Inflammation des cavités nasales	: < 25 ppm
Hyper-réactivité trachéale	: < 25 ppm
modification de la réaction	
inflammatoire pulmonaire	: > 50 ppm
Ralentissement de la croissance	: < 25 ppm

**Figure 2 - Effets des endotoxines sur la résistance vasculaire totale (RT) des poumons isolés et perfusés de porcelets soumis à différentes concentrations en ammoniac**



Δ : valeur significativement différente de celle du groupe I ( $p < 0,05$ )  
 \* : valeur significativement différente de la valeur au temps zéro ( $p < 0,05$ )  
 + : valeur significativement différente de celle mesurée dans le groupe II

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Professeurs A. DEWAELE et B. NICKS pour leur aide efficace et leurs conseils judicieux. Ce travail est subsidié par l'I.R.S.I.A. (Institut d'Encouragement pour la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture).

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AL MASHADANI E.H., BECK M., 1985. Env. Health. 64, 2056-2061.
- DOIG D.A., WILLOUGHBY R.A., 1971. J. Am. Vet. Med. Assoc. 159, 1353-1361.
- DRUMMOND J.G., CURTIS S.E., SIMON J., NORTON H.W., 1980. J. Animal Sci. 50, 1085-1091.
- DRUMMOND J.G., CURTIS S.E., MEYER R.C., SIMON J., NORTON H.W., 1981 a. Am. J. Vet. Res. 42, 963-968.
- DRUMMOND J.G., CURTIS S.E., SIMON J., NORTON H.W., 1981 b. Am. J. Vet. Res. 42, 969-974.
- GUSTIN P., URBAIN B., ANSAY M., 1991. Ann. Med. Vet. 135, 417-422.
- GUSTIN P., DELAUNOIS A., URBAIN B., ZEIMES K., ANSAY M., 1992. Vet. Res. Com. 16, 69-82.
- GUSTIN P., URBAIN B., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1993 a. Eur. Respir. J. 6, 605.
- GUSTIN P., URBAIN B., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1993 b. Tox. Appl. Pharmacol. (In press).
- LAITINEN L., HEINO A., KAVA F., HAAHTELA T., 1985. Am. Rev. Resp. Dis. 131, 599-606.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1992. Vet. Res. Com. 16, 453-464.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1993. Ann. Rech. Vet. (In press).