

LE NEZ DU PORC, BIO-INDICATEUR DE LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE

B. URBAIN, P. GUSTIN, J-F. PROUVOST, D. BEERENS, M. ANSAY

*Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pharmacologie et Toxicologie
Boulevard de Colonster, B41, B-4000 Liège, Belgique*

Les effets de l'ammoniac atmosphérique sur la muqueuse nasale ont été investigués chez des porcs exposés à 3 concentrations d'ammoniac (5, 25 et 50 ppm) dans une chambre d'inhalation. La technique du lavage nasal (NAL) a été utilisée pour mesurer le nombre de leucocytes et la concentration en albumine dans le liquide de lavage nasal. En utilisant une méthode morphométrique, l'infiltration inflammatoire, l'hyperplasie épithéliale et le pourcentage de surface ciliée ont été déterminées dans la muqueuse des cornets. Des augmentations du nombre de leucocytes et de la concentration en albumine dans le liquide de lavage nasal, ainsi que du nombre de leucocytes dans la muqueuse des cornets, liées à la concentration en ammoniac, ont été enregistrées. Une hyperplasie épithéliale liée à la concentration en ammoniac a également été relevée. Par contre, la ciliature de l'épithélium tendait à diminuer. L'augmentation du nombre de leucocytes, l'infiltration inflammatoire de la muqueuse des cornets, ainsi que l'hyperplasie épithéliale étaient significatives à des concentrations aussi faibles que 25 ppm.

The nose of the pig: bio-indicator of atmospheric pollution.

Effects of atmospheric ammonia on the nasal mucosa were investigated in pigs exposed to 3 NH₃ concentrations (5, 25 and 50 ppm) for 6 days in a specifically designed air-pollutant exposure chamber. Nasal lavage (NAL) was applied to measure the number of leucocytes and the albumin concentration in the NAL liquid. By use of a morphometrical method, the inflammatory infiltration, the epithelial hyperplasia and the epithelial ciliated surface was determined in the mucosa of the turbinates. Ammonia-concentration related increases were recorded in the number of leucocytes and in the albumin concentration in the NAL fluid, and in the number of leucocytes in the turbinate mucosa. An important ammonia-concentration related hyperplasia was recorded. The ciliated surface of the turbinate mucosa appeared to decrease with increasing ammonia concentration. Increases in the number of leucocytes in the NAL fluid, inflammatory cell infiltration and epithelial hyperplasia were significant at concentrations as low as 25 ppm.

INTRODUCTION

L'ammoniac est un gaz présent dans toutes les porcheries à des concentrations variables (2 à plus de 50 ppm) (CARSON, 1992). Les résultats des études relatives à la toxicité de l'ammoniac sont souvent contradictoires, essentiellement du fait de lacunes d'ordre méthodologiques. Les conditions d'exposition sont rarement détaillées. En outre, les méthodes utilisées pour détecter les effets de l'ammoniac sont qualitatives et ne permettent pas d'établir de relation dose-effet, nécessaire à la recherche d'une norme de pollution. Au cours de nos recherches, nous avons tenté de combler ces lacunes en développant des techniques adaptées à l'exposition des animaux à l'ammoniac (URBAIN et al, 1994) et à l'analyse quantitative des effets directs de ce gaz sur la muqueuse nasale. Deux méthodes d'investigation ont été développées :

- la première, le lavage nasal, est une technique simple, non-invasive, applicable sur le terrain, qui repose sur l'analyse cytologique et biochimique du liquide de lavage
- la seconde est basée sur l'analyse morphométrique de la muqueuse des cornets. C'est une technique invasive, applicable après l'abattage des animaux ou dans un cadre expérimental.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux et conditions d'exposition

Trente-quatre animaux d'un poids moyen de 27 kg ont été introduits dans une chambre d'exposition décrite précédemment (URBAIN et al, 1993). Brièvement, il s'agit d'un isolateur d'une capacité de 1,9 m³ où les conditions microclimatiques et la charge en polluants sont contrôlées. La ventilation est assurée par une turbine dont l'air propulsé est filtré. L'enrichissement en ammoniac (NH₃) a été réalisé en connectant une bonbonne contenant 25 % de ce gaz au système de ventilation. Les concentrations instantanées et moyennes en NH₃ ont été mesurées pendant l'essai.

1.2. Protocole expérimental

Trois groupes d'animaux ont été constitués : le groupe contrôle (n = 12) a été exposé à une concentration moyenne en ammoniac de 5 ppm (valeurs extrêmes 0 à 7 ppm); le groupe 25 ppm (n = 11) et le groupe 50 ppm (n = 11), ont été soumis à des concentrations moyennes respectives de 24 (21 - 29) ppm et 48 (45 - 60) ppm. La durée d'exposition était de 6 jours. Dans chaque groupe, 7 animaux ont subi un lavage nasal à la fin de la période d'exposition, tandis que les autres ont été sacrifiés pour prélever les cornets.

1.3. Lavage nasal

Le lavage nasal a été réalisé sur des porcelets anesthésiés en instillant dans chaque narine 5 ml de tampon phosphate à 37°C (PBS) à l'aide d'une seringue (URBAIN et al, 1994). Le liquide récolté dans les deux cavités nasales a été centrifugé (800 g à 4°C pendant 15 minutes). Chaque culot a été suspendu dans 0,9 ml de PBS contenant 16 % de N-acétyl-L-cystéine afin de dissoudre le mucus. Ensuite, les cellules ont été colorées avec 0,1 ml de violet de gentiane à 1 % et un comptage a été effectué sur une cellule de Thomas. Les résultats ont été exprimés en leucocytes par millilitre de

liquide récolté. Un dosage radioimmunologique de l'albumine a également été réalisé sur le surnageant (URBAIN et al, 1994) et les résultats ont été exprimés en nanogrammes par millilitre de liquide récolté.

1.4. Analyse morphologique de la muqueuse nasale

Après l'euthanasie des animaux, 5 ml de glutaraldéhyde à 2,5 % (4°C; pH 7,4) en tampon phosphate ont été injectés dans chaque narine. Le groin a ensuite été sectionné au niveau de la 2^{ème} prémolaire et les cornets ventraux ont été disséqués.

1.4.1. Comptage des cellules inflammatoires et détermination de l'hyperplasie épithéliale

Chaque cornet gauche a été coloré à l'hématoxyline-éosine en vue d'un examen optique. Huit zones ont été observées sur chaque coupe. Dans chacune d'elles, les cellules inflammatoires observées dans l'épithélium ont été dénombrées sur une longueur de 250 mm. Le nombre de noyaux de cellules épithéliales a également été compté sur la hauteur de l'épithélium. Le chorion de la muqueuse a été examiné sur une surface de 12500 mm² et les cellules inflammatoires y ont été recensées. Une moyenne du nombre de cellules observées sur les 8 zones a été calculée pour chaque cornet. Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules inflammatoires par unité de surface (12500 μm²) et par unité de longueur (250 μm) et en nombre de noyaux comptés sur la hauteur de l'épithélium.

1.4.2. Détermination du pourcentage de surface ciliée

Chaque cornet droit a été préparé en vue d'un examen au microscope électronique à balayage (LAMBOTTE et al, 1990). Huit photographies de la surface épithéliale ont été tirées pour chaque cornet. Chacune (grossissement x 300) a été examinée à l'aide d'un analyseur d'images (IMAGERIA BIOCUM 5000). Une valeur moyenne de pourcentage de la surface ciliée a été calculée pour chaque cornet.

1.5. Analyse statistique

Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne ± un écart-type. Les résultats ont été soumis à un test d'analyse de variance (ANOVA I). Quand l'anova était significative (p < 0,05), les moyennes ont été comparées par un test de *t de Student*. Des régressions linéaires ont été calculées entre les valeurs individuelles de chaque paramètres et la concentration en NH₃.

2. RÉSULTATS

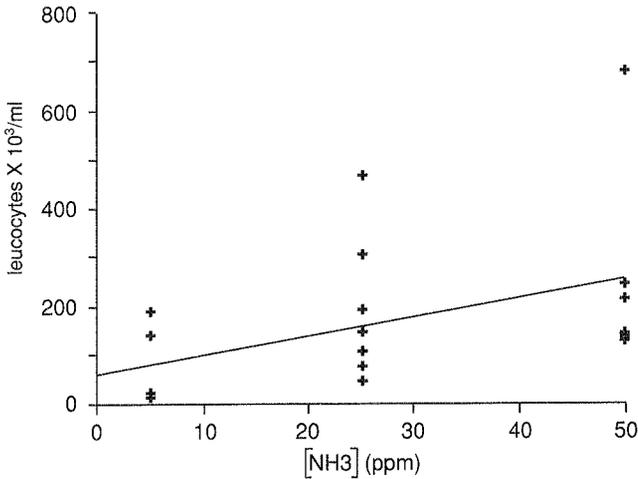
2.1. Effet du NH₃ sur la composition du liquide de lavage nasal

Une augmentation significative du nombre de cellules inflammatoires et de la concentration en albumine a été enregistrée (tableau 1, figure 1). L'équation de la régression linéaire entre les valeurs individuelles du nombre de leucocytes (y) et la concentration en ammoniac était $y = 59,29 + 3,78 [\text{NH}_3]$ ($r = 0,440$; $p < 0,047$). Cette augmentation était significative à partir de 25 ppm. Pour la concentration en albumine, l'équation correspondante était $y = 433 + 20,68 [\text{NH}_3]$ ($r = 0,459$; $p < 0,037$). Cependant il n'y avait pas de modifi-

cation significative de cette variable à aucune des concentrations testées.

Figure 1 - Valeurs individuelles (+) du nombre de leucocytes comptés dans le liquide de lavage nasal chez des porcelets soumis à des concentrations en ammoniac de 5, 25 ou 50 ppm pendant 6 jours.

La courbe est la régression linéaire (voir texte).



2.2. Modifications morphométriques

2.2.1. Réponse des cellules inflammatoires

Dans l'épithélium, la régression linéaire entre les valeurs individuelles du nombre de leucocytes (y) et la concentration en ammoniac était donnée par l'équation suivante : $y = 3,21 + 0,18 [NH_3]$ ($r = 0,843$; $p < 0,001$). Dans la lamina propria, l'équation liant les valeurs individuelles du nombre de cellules inflammatoires / $12500 \mu m^2$ (y) et la concentration en ammoniac était $y = 15,47 + 0,41 [NH_3]$ ($r = 0,795$; $p < 0,001$). Ces changements étaient significatifs à partir de 25 ppm (tableau 1 ; figure 2).

2.2.2. Hyperplasie épithéliale

L'augmentation du nombre de noyaux comptés sur la hauteur de l'épithélium (y) était linéairement liée à la concentration en ammoniac (figure 3) par l'équation suivante : $y = 2,34 + 0,02 [NH_3]$

Figure 2 - Valeurs individuelles du nombre de leucocytes* comptés sur une longueur de $250 \mu m$ dans l'épithélium des cornets (*) et sur une surface de $12500 \mu m^2$ dans la lamina propria (+) chez les porcelets soumis à des concentrations en ammoniac de 5, 25 ou 50 ppm pendant 6 jours.

La courbe est la régression linéaire (voir texte).

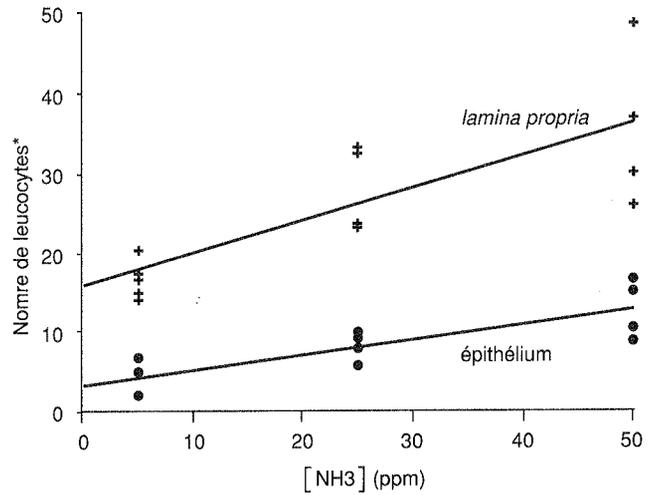


Figure 3 - Valeurs individuelles (+) du nombre de noyaux de cellules épithéliales comptés sur la hauteur de l'épithélium des cornets chez des porcelets soumis à des concentrations en ammoniac de 5, 25 ou 50 ppm pendant 6 jours.

La courbe est la régression linéaire (voir texte).

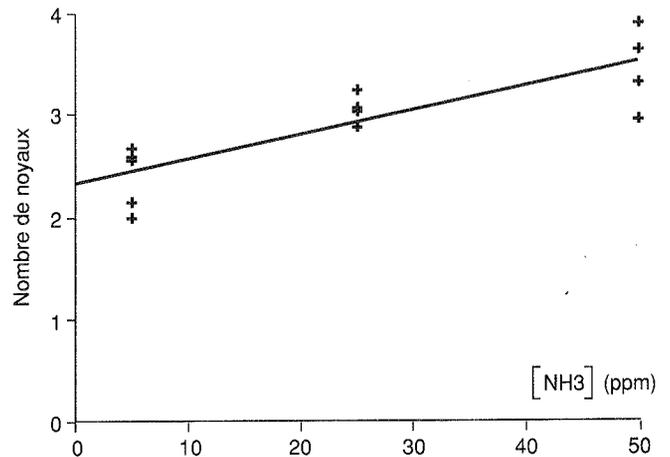


Tableau 1 - Nombre de leucocytes et concentration en albumine dans le liquide de lavage nasal, nombre de leucocytes dans l'épithélium et la lamina propria, nombre de noyaux de cellules épithéliales et pourcentage de la surface ciliée dans la muqueuse nasale après une exposition de 6 jours à l'ammoniac.

Paramètres	Concentration en ammoniac		
	Contrôle	25 ppm	50 ppm
Lavage nasal			
Leucocytes x $10^3/ml$	57,9 ± 75,4	190,2 ± 146,7 ^Δ	232,2 ± 201,9 ^Δ
Albumine (ng/ml)	639 ± 488	765 ± 439	1549 ± 1186
Morphométrie			
Infiltration de l'épithélium (leucocytes/250 μm)	4,1 ± 2,1	8,0 ± 1,6 ^Δ	12,4 ± 3,5 ^{ΔΔ}
Infiltration de la lamina propria (leucocytes/12500 μm ²)	16,6 ± 2,4	27,8 ± 5,5 ^{ΔΔ}	34,9 ± 10,0 ^{ΔΔ}
Hyperplasie épithéliale (nombre de noyaux)	2,4 ± 0,3	3,0 ± 0,1 ^{ΔΔ}	3,4 ± 0,4 ^{ΔΔ}
Surface ciliée (%)	62,6 ± 26,2	50,7 ± 31,4	27,6 ± 29,0

Δ : valeur significativement différente de la valeur contrôle (Δ : $p < 0,05$; ΔΔ : $p < 0,01$).

($r = 0,836$; $p < 0,001$). Cette augmentation était significative à des concentrations aussi faibles que 25 ppm (tableau 1).

2.2.3. Surface ciliée de l'épithélium

La surface ciliée tendait à diminuer avec l'augmentation de la concentration en ammoniac (tableau 1). L'équation de la régression linéaire entre les valeurs individuelles du pourcentage de surface ciliée (y) et la concentration en ammoniac était $y = 67,58 - 0,78 [\text{NH}_3]$ ($r = 0,498$; $p < 0,079$).

3. DISCUSSION

La toxicité de la pollution de l'air pour le système respiratoire est évaluée, chez le fermier, par des questionnaires médicaux et des tests de fonction pulmonaire, permettant d'établir des corrélations entre la concentration des contaminants de l'air et la fréquence et l'intensité des pathologies observées. De telles études épidémiologiques ne sont malheureusement pas disponibles chez le porc. La fréquence des lésions macroscopiques du tissu pulmonaire recensées à l'abattoir est souvent le seul critère mesuré (DONHAM, 1991). Le plus souvent, ces lésions sont la trace de pathologies antérieures influencées par un grand nombre de facteurs environnementaux et biologiques. La sensibilité des études épidémiologiques pourrait être améliorée en mesurant l'intensité des lésions respiratoires à un stade très précoce de leur développement. Le nez étant la porte d'entrée des polluants de l'air, une évaluation quantitative de leurs effets toxiques au niveau de la muqueuse nasale pourrait être proposée pour répondre à cet objectif.

Dans cette étude, la technique de lavage nasal et une méthode morphométrique ont été utilisées pour investiguer les effets directs de l'ammoniac atmosphérique sur la muqueuse nasale des porcelets au cours d'une exposition de 6 jours. Les résultats obtenus confirment que l'ammoniac est un irritant pour la muqueuse nasale. Non seulement, l'ammoniac induit un appel leucocytaire dans les cavités nasales mais il y déclenche une inflammation ainsi que le prouve l'élévation de la concentration en albumine.

La plupart des modifications morphologiques enregistrées étaient étroitement corrélées avec la concentration en ammoniac. En comparaison, le degré de corrélation entre les paramètres mesurés par la méthode du lavage nasal était moins marqué, vraisemblablement du fait de la différence de variabilité entre les mesures pratiquées par chacune des

techniques. Quoiqu'il en soit, les résultats permettent de proposer ces deux méthodes pour quantifier l'intensité de l'inflammation nasale en relation avec la présence d'un polluant dans des conditions expérimentales ou de terrain. Les résultats indiquent que la valeur du « *no effect level* » pour les porcs soumis à une exposition de 6 jours à l'ammoniac, est inférieure à 25 ppm. Si la limite de la normalité d'un paramètre est considérée comme étant la moyenne ajoutée d'un écart-type, le report de cette valeur sur la courbe dose-effet permet de proposer un niveau acceptable de pollution. Prenant en compte la relation liant le nombre de cellules inflammatoires dans le liquide de lavage, nous pouvons proposer 19 ppm comme concentration d'ammoniac maximale pouvant être tolérée dans l'air des porcheries. Le même raisonnement appliqué au comptage des cellules inflammatoires dans l'épithélium et la lamina propria permet de proposer des valeurs plus basses de 16 et 8 ppm respectivement. La valeur correspondante pour l'hyperplasie de l'épithélium est de 15 ppm. A titre d'information, la valeur recommandée par le C.I.G.R. (Commission Internationale du Génie Rural) pour les porcs est de 20 ppm. Pour l'homme, les concentrations maximales proposées sont de 35 et 25 ppm, pour des expositions respectives de 15 minutes et de 8 heures par jour 5 jours par semaine (ANDERSON et al, 1987).

CONCLUSIONS

L'analyse cytologique et biochimique du liquide de lavage nasal et l'étude morphométrique de la muqueuse nasale sont de bonnes méthodes pour quantifier les effets des polluants atmosphériques chez le porc. D'une manière générale, on constate que les modifications biologiques induites par l'ammoniac sont corrélées avec les concentrations présentes dans la chambre d'exposition, et que le « *no effect level* » pour une exposition de 6 jours à ce gaz est inférieur à 25 ppm. Le nez, organe sentinelle des pathologies respiratoires, peut être considéré comme un bio-indicateur de l'environnement des porcheries.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Professeurs A. DEWAELE, F. COIGNOUL et B. NICKS pour leur aide efficace et leurs conseils judicieux. Ce travail est subsidié par l'IRSIA (Institut pour l'Encouragement de la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON G.A., SMITH R.J., BUNDY D.S., 1987. J. Agric. Eng. Res. 37, 235-253.
- CARSON T.L., 1992. In «Diseases of swine». Wolfe éd, London, 777-790.
- C.I.G.R., 1984. In «Report of working group on climatization of animal houses». Scottish Farm Buildings Investigation Unit éd., Craibstone, 72 p.
- DONHAM K.J., 1991. Am. J. Vet. Res. 52, 1723-1730.
- LAMBOTTE J.L., CHARLIER G., PECHEUR M., COIGNOUL F., DEWAELE A., 1990. Ann. Méd. Vét. 134, 35-40
- URBAIN B, GUSTIN P, PROUVOST J.F., MICHEL O. NICKS B., ANSAY M., 1993. Vet. Res. 24, 503-514
- URBAIN B, GUSTIN P, PROUVOST J.F., ANSAY M., 1994. Am. J. Vet. Res. 55, 1335-1340.