

# Effets pulmonaires de la nébulisation d'endotoxines chez le porc

B. URBAIN, P. GUSTIN, D. BEERENS, M. ANSAY

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

## Effets pulmonaires de la nébulisation d'endotoxines chez le porc

Les effets pulmonaires aigus de l'inhalation d'endotoxines ont été investigués chez le porc. L'analyse du liquide de lavage broncho-alvéolaire a montré que la réponse cellulaire atteignait son maximum 24 heures après la nébulisation. L'augmentation du nombre de cellules totales était étroitement liée à la dose d'endotoxines aérosolisée (0 à 400 µg/kg), et expliquée par une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires et de polymorphonucléaires neutrophiles dans le liquide de lavage. La concentration en albumine dans liquide de lavage n'était pas influencée par l'administration d'endotoxines, reflétant l'intégrité de la barrière alvéolo-épithéliale. L'administration intrabronchique d'endotoxines (200 µg/kg) provoquait une multiplication du nombre de polymorphonucléaires neutrophiles beaucoup plus importante (x195) que par aérosolisation (x 6,5), tandis que cette même dose par voie intraveineuse était fatale pour les animaux. En conclusion, les endotoxines par voie aérogène sont capables de provoquer une réaction cellulaire pulmonaire, mais relativement faible due à une dilution de l'aérosol dans l'appareil respiratoire et une capture par les voies respiratoires extra-thoraciques, ainsi qu'à la résistance de l'épithélium alvéolaire vis-à-vis des endotoxines.

## Acute effects of endotoxin inhalation on the respiratory tract in pigs

The acute effects of endotoxin inhalation on deep lung tissue were investigated in pigs. The cellular response, assessed by analysis of the liquid from broncho-alveolar washes (BAW), showed that the maximal response was recorded 24 h after nebulization. A close relationship was noted between total cell counts and the dose of endotoxin administered (from 0 upto 400 µg/kg), explained by an increase in alveolar macrophage and neutrophil numbers in the wash liquid. Albumin concentrations in BAW remained unchanged, reflecting the integrity of the alveolar-capillary barrier. Intrabronchial administration of 200 µg/kg of endotoxins caused a greater neutrophil response (x 195 fold), compared to nebulization (x 6.5 fold). Intravenous administration of the same dose caused the death of the pigs. It is concluded that endotoxin inhalation in pigs causes a cellular lung response, but it is relatively low probably due to dilution of the aerosol throughout the respiratory system, by the extrathoracic airway trapping the aerosol and by alveolar epithelial resistance in relation to the endotoxins.

## INTRODUCTION

Les maladies respiratoires du porc comptent parmi les pathologies les plus fréquentes dans les unités d'élevage intensif. A côté des microorganismes directement responsables de ces maladies, les contaminants de l'air des porcheries tels les poussières, l'ammoniac ou les endotoxines sont suspectés être des facteurs aggravant ou déclenchant les pathologies. En effet, le porc, de par son mode d'élevage, est fortement exposé aux polluants de l'air. Parmi ces derniers, les endotoxines sont suspectées par les épidémiologistes d'être potentiellement pathogènes, au vu de corrélations étroites établies entre les concentrations en endotoxines dans les exploitations et la prévalence des maladies chez l'homme et l'animal (DONHAM et al; HEEDERICK et al, 1991).

Les endotoxines, constituants de la membrane externe des bactéries gram-négatives, sont connues pour leur pouvoir pro-inflammatoire puissant chez les animaux de laboratoire. Chez le porc, si les effets par voie intraveineuse sont largement documentés (OLSON et al, 1992), les résultats d'une exposition par voie aérogène ne sont pas connus. C'est pourquoi le but de cette étude était de caractériser chez le porc, les effets aigus de la nébulisation d'endotoxines sur les poumons et de les comparer à ceux obtenus par administration intraveineuse ou intra-bronchique. Les effets des différentes expositions ont été recherchés par analyse de la composition cytologique et biochimique du liquide de lavage broncho-alvéolaire.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux et méthodes d'inhalation des endotoxines

Trente-sept porcelets Landrace Belge (12 à 16 kg) ont été sélectionnés pour cette étude. Des endotoxines (lipopolysaccharides) d'*Escherichia coli* lyophilisées de sérotype O127:B8 ou O55:B5 ont été dissoutes dans une solution saline (9‰) aux concentrations suivantes: 0,35; 1,4; 3,5; 7 et 14 mg/ml. Les lipopolysaccharides ont été nébulisés à l'aide d'un dosimètre Méfar MB3 connecté à un masque facial. L'avantage de cet appareil est qu'il permet de délivrer avec exactitude une quantité d'aérosol donnée à chaque inspiration de l'animal et donc de contrôler la dose administrée.

### 1.2. Protocole expérimental

La nébulisation a été réalisée sur des porcelets anesthésiés. Chaque porcelet a été nébulisé avec une seule des doses d'endotoxines suivantes: 0 (n=6), 10 (n=3), 40 (n=4), 100 (n=3), 200 (n=4) et 400 (n=4) µg/kg. Chaque porcelet a inhalé de 92 à 124 nuages d'aérosol pendant une durée moyenne de 30 minutes. Vingt-quatre heures après, un examen clinique sommaire a été réalisé et des échantillons sanguins récoltés. Ensuite, les porcelets ont été sacrifiés et les poumons prélevés. Afin

d'établir une courbe de réponse en fonction du temps, 10 porcelets ont été testés avec une même dose d'endotoxines (400 µg/kg) et sacrifiés 0, 6, 18, 24 et 48 heures après la nébulisation.

De façon à pouvoir comparer la réponse de l'inhalation d'endotoxines à celle enregistrée lorsque les endotoxines sont directement administrées dans le poumon, 10 ml d'une solution saline contenant des lipopolysaccharides (sérototype O127:B8) (200 µg/kg) ont été injectés chez trois animaux, via un cathéter directement dans la bronche principale droite, sous radioscopie. La réponse induite par l'administration intraveineuse de 20 ml de solution saline contenant des lipopolysaccharides (O127:B8) (200 µg/kg) a également été recherchée en infusant ce volume pendant 30 minutes à l'aide d'un injecteur automatique. Enfin, l'influence du sérotipe sur les effets par nébulisation a été recherchée en comparant les résultats obtenus en utilisant le sérotipe O55:B5 (200 µg/kg).

### 1.3. Lavage broncho-alvéolaire

Après prélèvement des poumons, un tube trachéal (3,5 mm) a été introduit dans la bronche principale du lobe diaphragmatique droit. Ce dernier a alors été lavé 3 fois avec 20 ml d'une solution saline (9‰) (volume total 60 ml). Le pourcentage de volume récolté était de 67,5 %. Un aliquot de liquide a été coloré au violet de gentiane à 1‰ et un comptage du nombre de cellules totales a été réalisé sur un hémacytomètre de Thoma. Les résultats ont été exprimés en cellules totales par ml de volume récolté. Une différenciation cellulaire a été réalisée après coloration de frottis à l'Hemacolor. Le liquide a ensuite été centrifugé (800 G à 4°C pendant 15 minutes) et le surnageant récolté. Un dosage radioimmunologique de l'albumine a alors été réalisé (URBAIN et al, 1994) et les résultats ont été exprimés en µg/ml de volume récolté.

### 1.4. Analyse statistique

Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes ± 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 endotoxines.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Réponse clinique à la nébulisation d'endotoxines

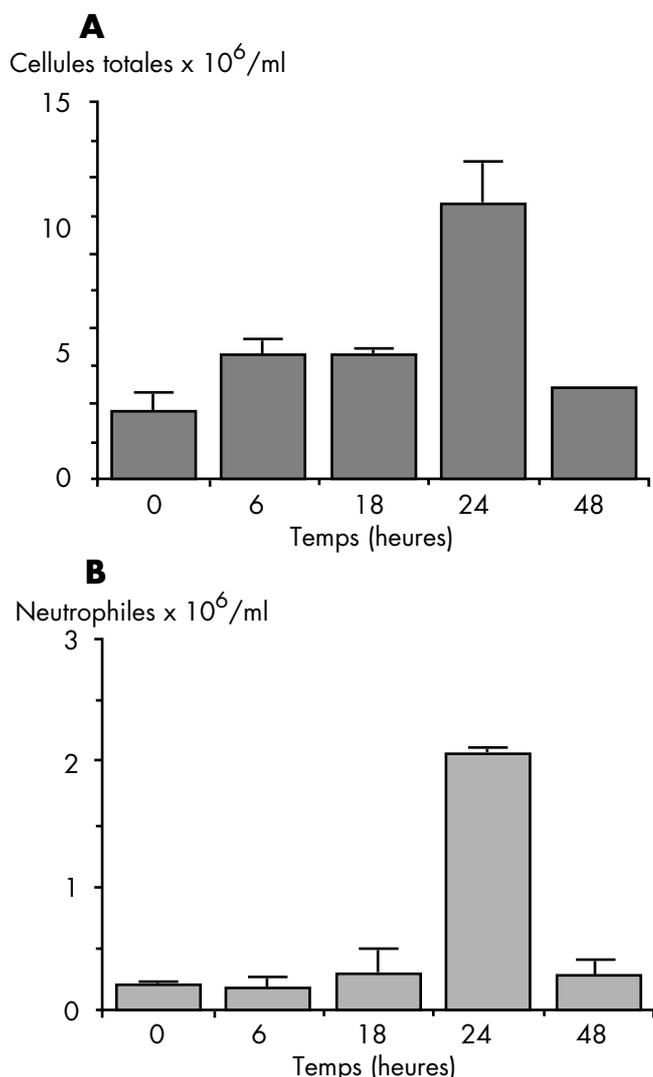
Aucun signe clinique spécifique n'a été observé dans les différents groupes. La température corporelle et la formule sanguine sont restées dans des normes physiologiques.

## 2.2. Effets de la nébulisation d'endotoxines sur la composition du liquide de lavage broncho-alvéolaire.

La réponse en fonction du temps sur le nombre de cellules totales et de polymorphonucléaires neutrophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire suivant l'administration par aérosol d'endotoxines (sérotype O127:B8, 400 µg/kg) est illustrée à la figure 1. Il apparaît clairement que la réponse maximale est enregistrée 24 heures après la nébulisation. Après 48 heures, les paramètres retournent à leurs valeurs de base.

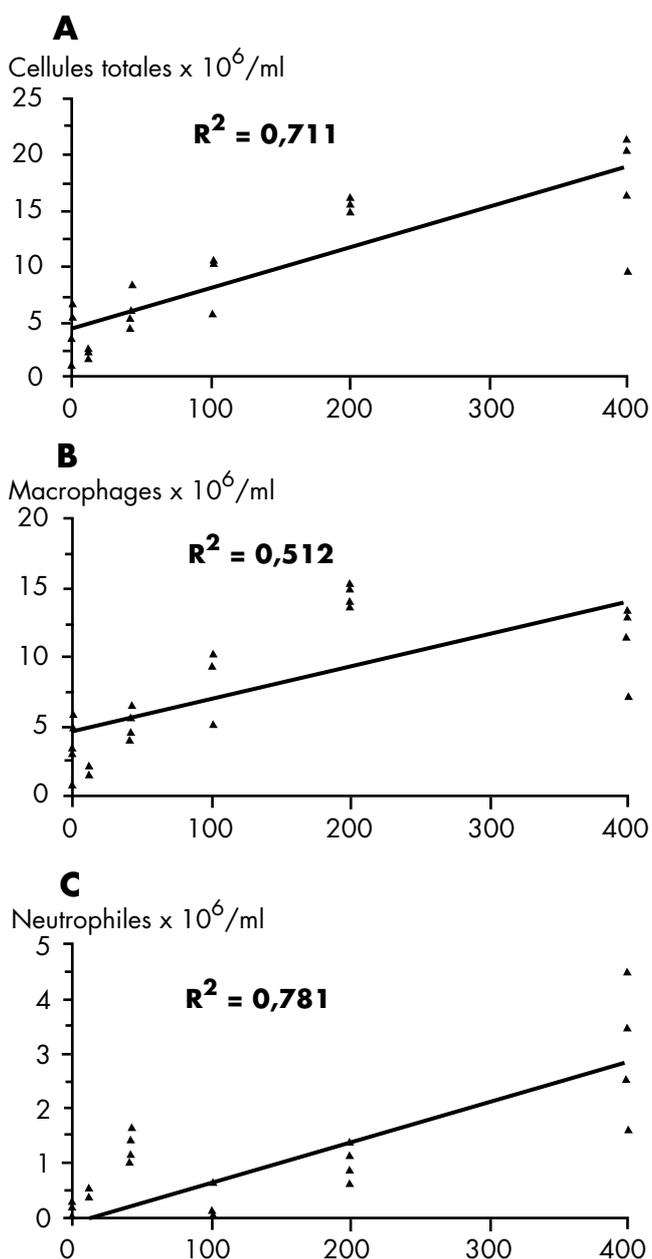
Quand la réponse enregistrée 24 heures après l'administration d'endotoxines (sérotype O127:B8) était considérée, une augmentation significative du taux de cellules, liée à la dose, était enregistrée (figure 2). L'équation de la régression linéaire établie entre les valeurs individuelles

**Figure 1** - Nombre de cellules totales (A) et de polymorphonucléaires neutrophiles (B) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire en fonction du temps, après une nébulisation d'endotoxines (400 µg/kg) (n = 2 dans chaque groupe)



du nombre de cellules totales (y) enregistrée 24 heures après la nébulisation et la dose d'endotoxines ([endo]) était  $y = 4,521 \cdot 10^6 + 0,035 \cdot 10^6 [\text{endo}]$  ( $r^2 = 0,711$ ;  $p < 0,001$ ) (n= 24). Cette augmentation était significative ( $p < 0,05$ ) à partir d'une exposition en endotoxines de 100 µg/kg). L'augmentation du nombre de leucocytes était partiellement due aux macrophages alvéolaires. L'équation de la régression linéaire établie entre les valeurs individuelles du nombre de macrophages alvéolaires (y) enregistrée 24 heures après la nébulisation et la dose d'endotoxines ([endo]) était  $y = 4,622 \cdot 10^6 + 0,023 \cdot 10^6 [\text{endo}]$  ( $r^2 = 0,512$ ;  $p < 0,001$ ) (figure 2).

**Figure 2** - Valeurs individuelles du nombre de cellules totales (A), de macrophages alvéolaires (B) et de polymorphonucléaires (C) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire chez des animaux témoins et nébulisés avec des endotoxines. Les corbes sont les régressions linéaires (voir texte)



L'augmentation du nombre de polymorphonucléaires neutrophiles était mieux corrélée; l'équation correspondante était  $y = -0,073.10^6 + 0,007.10^6$  [endo] ( $r^2 = 0,781$ ;  $p < 0,001$ ) (figure 2). Les augmentations du nombre de macrophages et de polymorphonucléaires neutrophiles étaient respectivement significatives ( $p < 0,05$ ) aux doses de 100 et 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'endotoxines. Des différences significatives dans le nombre de lymphocytes étaient observées uniquement à la plus forte dose d'endotoxines (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ( $2,448 \pm 1,394.10^6$  vs  $0,142 \pm 0,102.10^6$  dans le groupe témoin;  $p < 0,01$ ).

Aucune modification de la concentration en albumine attribuable à la nébulisation aux endotoxines n'a été enregistrée. Les valeurs variaient de 32 à 178  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et le coefficient de corrélation correspondant ( $r^2$ ) de la régression linéaire était de 0,185.

### 2.3. Influence du sérotype et de la voie d'administration sur la réponse pulmonaire aux endotoxines (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

La réponse induite par la nébulisation du sérotype O55:B5 s'est avérée identique à celle provoquée par le

sérotype O127:B8, ainsi que l'a montré la composition du liquide de lavage broncho-alvéolaire (tableau 1).

Vingt-quatre heures après l'administration intrabronchique d'endotoxines (O127:B8), les animaux étaient abattus, mais sans qu'une élévation de la température soit enregistrée. Cependant, une leucocytose a été enregistrée (de  $15463 \pm 2514$  à  $25406 \pm 3912$  leucocytes/ $\text{mm}^3$ ), due à une neutrophilie (de  $8863 \pm 2726$  à  $19440 \pm 2161$  polymorphonucléaires neutrophiles/ $\text{mm}^3$ ). Dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, une augmentation significative du nombre de cellules totales, due à des augmentations du nombre de macrophages alvéolaires et de polymorphonucléaires neutrophiles a été enregistrée. Par contre, il n'y avait pas de modifications de la concentration en albumine (tableau 1).

L'administration d'endotoxines (O127:B8) par voie intraveineuse a provoqué la mort des animaux durant la nuit. Des lésions comparables à celles d'un choc septique ont été observées. La réponse cellulaire observée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire était comparable à celle obtenue après une nébulisation. Cependant, une augmentation marquée de la concentration en albumine a été enregistrée (tableau 1).

**Tableau 1** - Nombre de cellules totales, de macrophages alvéolaires, de polymorphonucléaires neutrophiles et concentrations en albumine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire chez des porcelets nébulisés avec des endotoxines de sérotype O127:B8 et O55:B5, et comparés avec une administration intrabronchique ou intraveineuse (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Paramètres	Témoins (n = 6)	Nébulisation O127:B8 (n=4)	Intrabronchique O127:B8 (n=3)	Intraveineuse O127:B8 (n=2)	Nébulisation O55:B5 (n=3)
Cellules totales (x $10^6/\text{ml}$ )	4,280 $\pm$ 2,047	15,627 $\pm$ 0,567***	49,483 $\pm$ 17,394 $\Delta\Delta$ ***	19,625 $\pm$ 13,871*	16,050 $\pm$ 7,828**
Macrophages (x $10^6/\text{ml}$ )	3,966 $\pm$ 1,856	14,460 $\pm$ 0,763***	19,347 $\pm$ 6,204***	17,518 $\pm$ 12,696*	13,297 $\pm$ 8,112*
Neutrophiles (x $10^6/\text{ml}$ )	0,154 $\pm$ 0,106	1,013 $\pm$ 0,320***	30,022 $\pm$ 11,593 $\Delta\Delta$ ***	1,422 $\pm$ 0,901**	2,129 $\pm$ 0,917***
Albumine ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	111 $\pm$ 57	80 $\pm$ 24	242 $\pm$ 320	1006 $\pm$ 199 $\Delta\Delta$ ***	179 $\pm$ 169

Les valeurs sont des moyennes et déviations standards

\*: significativement différent des valeurs enregistrées dans le groupe témoin (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

$\Delta$ : significativement différent des valeurs enregistrées dans le groupe nébulisé avec le sérotype O127:B8 ( $\Delta\Delta$   $p < 0,01$ )

### 3. DISCUSSION

Dans cette étude, les effets pulmonaires d'endotoxines d'*Escherichia coli* administrées par aérosol chez des porcelets ont été recherchés par l'analyse du liquide de lavage broncho-alvéolaire. Les réponses systémiques et respiratoires aux endotoxines ont été largement investiguées chez le porc après administration intraveineuse et ont fait récemment l'objet d'un article de synthèse (OLSON et al, 1992). Brièvement, les porcs endotoxémiques présentent,

dans les premières heures suivant l'administration, des troubles hémodynamiques caractérisés par une chute du débit sanguin et une hypertension pulmonaires, avec une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire. Il en résulte alors une inadéquation du rapport entre la ventilation et la perfusion d'autant plus aggravée par la formation d'œdème alvéolaire due à une augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire à l'eau et à l'albumine. L'examen histologique des poumons dans ce modèle montrait une extravasation d'érythrocytes, de neu-

trophiles et de l'oedème alvéolaire. Le même type de réponse a été observé *in vitro* dans un modèle de poumon de porc isolé et perfusé aux endotoxines (URBAIN et al, 1992). La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus dans la présente étude montre que la réponse cellulaire pulmonaire aux endotoxines aérosolisées chez le porc est qualitativement similaire à celle observée après une administration intraveineuse. Cependant, les effets sont de moindre amplitude et apparaissent plus tardivement qu'après l'administration intraveineuse. De plus, le fait que la concentration en albumine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ne varie pas, signe l'absence de formation d'oedème alvéolaire. Enfin, les doses nécessaires pour observer des réponses dans notre étude (100 à 400 µg/kg pendant 30 minutes) sont beaucoup plus élevées que celles nécessaires pour observer des effets par voie aérogène chez les animaux de laboratoire (GORDON et al, 1994) ou par voie intraveineuse chez le porc (11 à 12 µg/kg pendant 4 à 5 heures) (OLSON et al, 1992). L'origine de ces contradictions aurait pu être le choix du sérotype, cependant cette hypothèse doit être éliminée étant donné que la réponse pulmonaire à l'inhalation des deux sérotypes utilisés, O127:B8 et O55:B5, était identique. La réponse respiratoire du porc aux endotoxines par voie aérogène semble donc beaucoup plus faible que celle observée par voie intraveineuse.

D'après nos résultats, d'autres facteurs doivent être à l'origine des contradictions. Le fait que les animaux n'ont pas survécu à l'administration intraveineuse d'endotoxines démontre la grande différence de réactivité attribuable à la voie d'administration. L'administration intrabronchique

d'endotoxines a provoqué, dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, une multiplication du nombre de polymorphonucléaires neutrophiles d'un facteur 195 par rapport au groupe témoin; dans le groupe nébulisé, ce facteur était seulement de 6,5. Cette différence de réactivité peut être attribuée au fait que la nébulisation consiste en une large dispersion et une dilution de l'aérosol à travers tout le système respiratoire. De plus, le dépôt de l'aérosol dans les voies profondes pourrait être réduit par la capture partielle de l'aérosol au niveau des voies respiratoires extra-thoraciques. Enfin, le taux d'albumine ne se trouvait modifié qu'après administration intraveineuse, suggérant que l'épithélium alvéolaire joue un rôle de barrière vis-à-vis des endotoxines.

## CONCLUSIONS

L'aérosolisation d'endotoxines chez le porc produit une réponse inflammatoire cellulaire au niveau pulmonaire, mais sans induire d'oedème alvéolaire. La faible amplitude des réactions induites par l'aérosolisation en comparaison de celle obtenue par voie intraveineuse et intrabronchique est expliquée par le rôle de barrière joué par l'épithélium alvéolaire et par la capture de l'aérosol dans le système respiratoire.

## REMERCIEMENTS

Ce travail est subsidié par l'IRISIA (Institut pour l'Encouragement de la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DONHAM K.J., 1991. *Am. J. Vet. Res.*, 52, 1723-1730.
- GORDON T. 1994. *Inhal. Toxicol.*, 6, 253-266.
- HEEDERICK D., BROUWER R., BIERSTEKER K., BOLEIJ S.M., 1991. *Int. Arch. Occup. Env. Health*, 62, 595-601.
- OLSON N.C., KRUSE-ELLIOTT K.T., DODAM J.R., 1992. *JAVMA*, 200, 1870-1884.
- URBAIN B., GUSTIN P., ANSAY M., 1992. *Vet. Res. Comm.*, 16, 453-464.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1994. *Am. J. Vet. Res.*, 55, 1335-1340.