

# Effet de l'ammoniac sur la fibre-C impliquée dans le réflexe de la toux chez le porc

B.MOREAUX, A. NEMMAR, P.GUSTIN

*Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Département de Pharmacologie-Pharmacothérapie et Toxicologie  
Boulevard de Colonster 20, B 41, B-4000 Liège, Belgique*

*Avec la collaboration technique de D.Beerens*

## **Effet de l'ammoniac sur la fibre-C impliquée dans le réflexe de la toux chez le porc**

Afin d'étudier l'effet de l'ammoniac sur la fibre-C impliquée dans le réflexe de la toux induite par l'acide citrique chez le porc, des porcelets ont été exposés pendant une période de 24 heures ou de 4 jours à une concentration de 15 ou 30 ppm d'ammoniac. Au cours de ces expositions, les animaux ont subi plusieurs tests de provocation de la toux à deux jours d'intervalle. De même un groupe de porcelets a été exposé à l'ammoniac (30ppm) pendant 48 heures et, à la fin de l'exposition, la substance P a été dosée dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire et trachéal (BAL et TAL) de même que dans des fragments de muqueuse bronchique et trachéale. L'ammoniac à une concentration de 30 ppm induit une inhibition du réflexe de la toux mais cette exposition doit être au minimum de 48 heures. De même à cette concentration, l'ammoniac provoque une augmentation significative de la concentration en substance P dans les liquides BAL et TAL et une diminution significative dans le fragment de la muqueuse trachéale. En conclusion, l'ammoniac inhibe le réflexe de la toux induite par l'acide citrique à une concentration de 30 ppm, et provoque également la libération de la substance P de la fibre-C.

## **The effect of ammonia on the C-fibre which is involved in the coughing reflex in pigs**

The effect of ammonia on the C-fibre which is involved in the citric acid induced coughing reflex was assessed. The piglets were exposed during a period of 24 hours or 4 days to a concentration of 15 or 30 ppm ammonia in an inhalation chamber. During this challenge, the animals underwent cough induction tests at two days intervals. Another group was exposed to ammonia (30 ppm) for 48 hours, after this period, substance P was assayed in liquids collected from broncho-alveolar and tracheal washings (BAL and TAL) and in tracheal and airway mucosa. Ammonia (30 ppm) induced an inhibition of the coughing reflex in pigs. The minimum period of exposure necessary to provoke this effect was 48 hours. The same ammonia concentration also induced a significant increase in substance P concentrations in BAL and TAL and a significant decrease in concentrations of the tracheal mucosa. We conclude that ammonia at a concentration of 30 ppm inhibits the citric acid induced coughing reflex. The effect was partly mediated by the release of substance P from the C-fibre.

## INTRODUCTION

L'ammoniac est un gaz soluble fréquemment rencontré dans les porcheries. Les concentrations enregistrées n'excèdent pas souvent 12 ppm, mais peuvent atteindre des concentrations comprises entre 25 et 50 ppm voire atteindre des pics de 100 ppm lorsque la production excède la capacité d'élimination des systèmes de ventilation (BESKOW *et al.*, 1998). Les effets de l'ammoniac sur le tractus respiratoire ont été largement documentés au cours de ces dernières années. URBAIN *et al.* (1994, 1996 et 1999) ont notamment montré que l'ammoniac provoque des lésions cellulaires, une augmentation de la perméabilité de l'épithélium des voies aériennes, une infiltration de la muqueuse nasale par les différents types de cellules inflammatoires, une hyperplasie épithéliale et une destruction des cils vibratiles.

Bien que la toux soit un des premiers mécanismes de défense du système respiratoire contre l'envahissement par des agents biologiques, physiques et chimiques et que cette réaction soit souvent un des symptômes majeurs rencontrés lors de nombreuses pathologies respiratoires, peu de travaux ont été consacrés à l'étude des effets de l'ammoniac sur le réflexe de la toux. STOMBAUGH *et al.* (1969) et DRUMMOND *et al.* (1980) ont montré que l'ammoniac pouvait être un facteur tussigène mais à des concentrations supérieures à 100 ppm. Plus récemment, le pouvoir inhibiteur de l'ammoniac vis-à-vis du réflexe de la toux induite par l'acide citrique chez des porcelets exposés à une concentration de 30 ppm pendant 48 heures a été décrit (MOREAUX et GUSTIN, 1999a). Cette inhibition est un phénomène réversible, la récupération du réflexe étant observée après une période de 5 jours.

Les effets de l'ammoniac sur les récepteurs nerveux impliqués dans le réflexe de la toux sont peu documentés. Les fibres-C sont des structures nerveuses amyélinisées capables de libérer des neuropeptides comme la substance P qui, à son tour stimule, les récepteurs (RARs) à l'origine de la toux. En outre, NAIDA *et al.* (1996) ont montré que l'ammoniac peut stimuler les fibres non-myélinisées de type C, mais les conséquences de cette activation sur le réflexe de la toux n'ont pas été explorées. Le but de cette étude était de préciser l'effet inhibiteur de l'ammoniac sur la toux induite par l'acide citrique chez le porcelet, et plus particulièrement de définir l'impact des concentrations enregistrées dans les porcheries et d'identifier son mécanisme d'action.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux

Des porcelets Landrace Belge des deux sexes ont été sélectionnés pour cette étude. Les animaux, pesant en moyenne 12 kg, ont été préalablement introduits dans un local constitué d'un caillebotis surélevé par rapport au sol (40 cm), dépourvu de litière et où le lisier était éliminé quotidiennement. Les animaux ont été nourris exclusivement avec des pellets (Baby starter, Schyns, Battice, Belgium) et de l'eau *ad libitum*. Ces conditions d'hébergement particulières

visaient à maintenir les concentrations en poussières et en ammoniac à un niveau minimal avant l'expérimentation.

### 1.2. Méthode de provocation de la toux par l'acide citrique

Les porcelets sont introduits individuellement dans une chambre d'inhalation dont les caractéristiques ont été décrites précédemment (URBAIN *et al.*, 1993). Brièvement, les conditions de réalisation du test sont les suivantes (MOREAUX *et al.*, 1999b). La capacité de la chambre est de 1,9 m<sup>3</sup>. Les conditions climatiques et la charge en polluants sont contrôlées. La chambre est nettoyée quotidiennement afin d'éviter tout dégagement d'ammoniac par le lisier. L'air entrant et sortant est filtré. Un nébulisateur ultrasonique (DeVillbiss, ultra-neb 2000, Somerset, PA, USA) produisant des particules comprises entre 0,5 et 5 µm (indication du fabricant) est connecté à l'entrée d'air. La ventilation de la chambre est arrêtée pendant la période de nébulisation afin de permettre une répartition plus homogène des particules.

L'acide citrique (Merck réf. 1.00244, Germany) est dissout dans une solution saline (NaCl 0.9%) à la concentration de 0,8 M. L'absence d'effet tussigène de la solution saline a été vérifiée préalablement. Le porcelet est soumis à une nébulisation d'acide citrique à la concentration de 0,8 M pendant quinze minutes. Après la période de nébulisation, la chambre d'inhalation est à nouveau ventilée pendant une période de quinze minutes pour extraire l'acide citrique encore présent. La toux est comptée par un observateur pendant les deux périodes de quinze minutes. La fréquence de la toux est exprimée en nombre de toux compté pendant trente minutes.

### 1.3. Méthode d'exposition à l'ammoniac

L'enrichissement de la chambre en ammoniac (NH<sub>3</sub>) a été réalisé en connectant une bonbonne contenant 15 % de ce gaz au circuit d'arrivée d'air. Le taux d'ammoniac est relevé quotidiennement au moyen de pipette colorimétrique 3L (Scantec, Antwerpen, Belgium).

### 1.4. Protocole expérimental

Les animaux des deux premiers groupes contrôles (n=5 et n=5), ont été placés pendant cinq jours dans la chambre d'inhalation. Durant cette période, ils ont subi trois tests de provocation de la toux à deux jours d'intervalle (J1, J3, J5). Le taux d'ammoniac relevé quotidiennement était inférieur à 1 ppm.

Les animaux de deux groupes test (n=4 et n=6) ont été également placés dans la même chambre d'inhalation pendant cinq jours. Ils ont subi trois tests de provocation de la toux induite par l'acide citrique à deux jours d'intervalle (J1, J3, J5). Le premier test de provocation de la toux (J1) a servi de valeur contrôle. Ensuite, les animaux ont été immédiatement exposés à une concentration en ammoniac d'environ 15 ou 30 ppm, pendant quatre jours. Les moyennes des concentrations en ammoniac relevées quotidiennement pendant les quatre jours ont été respectivement de 18 ± 7 ppm et de

29 ± 2 ppm. Les porcelets ont subi le test à l'acide citrique aux jours trois et cinq (J3 et J5) dans une autre chambre d'inhalation que celle utilisée pour l'exposition des animaux à l'ammoniac afin d'éviter une interaction de type acide base entre l'acide citrique et le gaz. Cette deuxième chambre possède les mêmes caractéristiques que la première.

Un autre groupe de porcelets (n=4) a subi deux tests de provocation de la toux à deux jours d'intervalle (J1 et J3). Les animaux ont été exposés à une concentration en ammoniac de 30 ppm pendant 24 heures, juste avant le deuxième test de provocation de la toux, le premier test servant de valeur contrôle. De même, un groupe contrôle de 5 porcelets a été stimulé deux fois à deux jours d'intervalle.

### 1.5. Dosage de la substance P

Finalement, un dernier groupe de porcelets (n=4) a été exposé à une concentration en ammoniac de 30 ppm pendant 48 heures. Après cette exposition, les porcelets ont été immédiatement euthanasiés par une injection de thiopental (dose létale). Les animaux ont été saignés par une incision des deux artères fémorales. Ensuite, le bloc cardio-pulmonaire a été extrait de la cage thoracique. Un lavage broncho-alvéolaire a été effectué sur le lobe diaphragmatique droit en y introduisant un tube endotrachéal (Ruschelit number 112480, ID 4 mm). Le poumon a été lavé trois fois avec 20 ml de PBS. Le liquide de lavage a été récupéré dans des tubes en polypropylène contenant 5% du volume total d'acide acétique 2M. Le liquide de lavage a été centrifugé et la substance P a été extraite et dosée par une méthode RIA (NEMMAR *et al.*, 1998). De même, une section de la trachée de 5 cm de long a été lavée complètement en clampant une des extrémités. Les liquides ont été recueillis dans des tubes de polypropylène et de l'acide acétique 2M a été ajouté à une concentration de 5% du volume total. Ensuite, ces échantillons ont subi la même procédure d'extraction et de dosage que les liquides de lavage broncho-alvéolaire.

Des fragments de 1 cm<sup>2</sup> de la muqueuse trachéale et de la muqueuse bronchique (au niveau de la bronche principale gauche) ont été disséqués puis introduits dans un tube de polypropylène contenant 500 µl de PBS et 5 ml d'acide acétique 2M. Ces échantillons de muqueuse sont broyés à l'ultraturax, puis incubés à 90 °C pendant 10 minutes. Enfin, les échantillons sont centrifugés pendant 30 minutes à 2400g. Le surnageant est récolté et congelé à -20°C jusqu'au dosage. Le dosage de la substance P extraite de la muqueuse est identique à celui utilisé pour les liquides de lavage broncho-alvéolaire et trachéal.

### 1.6. Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes ± une déviation standard. Les résultats ont été soumis à un test d'analyse de variance (ANOVA) ou à un test de normalité. Quand l'anova était significative (p < 0,05), les moyennes ont été comparées par un test t de Student. Les différences sont significatives lorsque p < 0,05.

## 2. RÉSULTATS

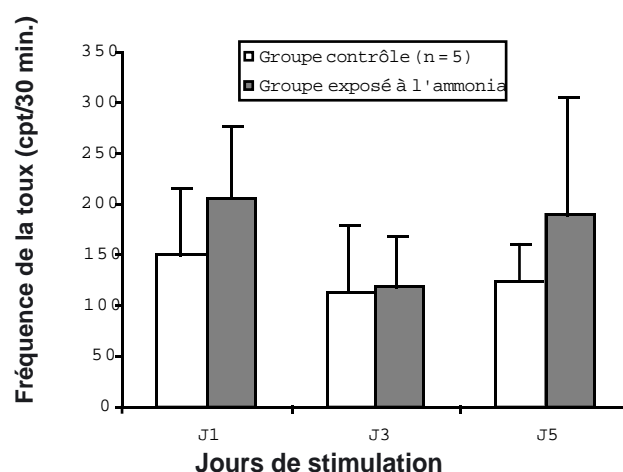
### 2.1. Réponse clinique à l'exposition à l'ammoniac et au test de provocation de la toux

Aucun signe clinique n'a été observé pendant que les porcelets ont été exposés aux concentrations de 15 et de 30 ppm en ammoniac. Pendant le test de provocation de la toux, de la salivation a été observée chez certains animaux, indépendamment de l'exposition à l'ammoniac.

### 2.2. Effet de l'ammoniac sur la fréquence de la toux

Après une exposition à l'ammoniac de 96 heures à une concentration de 15 ppm, aucune modification de la fréquence de la toux induite par l'acide citrique n'a été enregistrée (figure 1). Lorsque les animaux sont exposés à une concentration de 30 ppm, un effet inhibiteur est enregistré (figure 2, p22). La figure 3, p22 montre l'effet d'une exposition à l'ammoniac à la concentration de 30 ppm pendant 24 heures sur la fréquence de la toux induite par l'acide citrique. Cette exposition n'influence pas la fréquence de la toux comptée au cours du test de provocation de la toux.

**Figure 1** - Effet de l'ammoniac à la concentration de 15 ppm sur la toux induite par l'acide citrique chez le porc. Les porcelets ont subi trois tests de provocation de la toux à deux jours d'intervalle (J1, J3, J5). Après le premier test, les animaux du groupe test sont exposés à l'ammoniac pendant 4 jours. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SD.



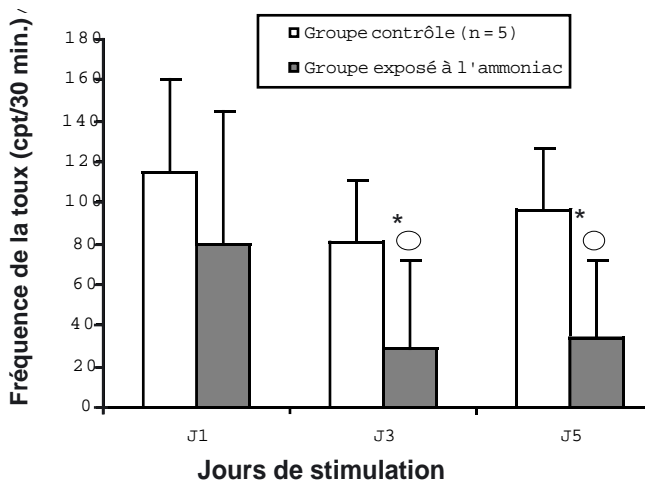
### 2.3. Effet de l'ammoniac sur la fibre-C

Le tableau 1 (p. 22) illustre l'effet de l'ammoniac sur la concentration en substance P dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et trachéal ainsi que dans la muqueuse bronchique et trachéale. Une augmentation significative de la concentration de ce neuropeptide dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et trachéal est constatée

alors que celle mesurée dans la muqueuse trachéale est significativement réduite. Au niveau de la muqueuse bronchique, cette diminution n'est pas significative.

**Figure 2** - Effet de l'ammoniac à la concentration de 30 ppm sur la toux induite par l'acide citrique chez le porc.

Les porcelets ont subi trois tests de provocation de la toux à deux jours d'intervalle (J1, J3, J5). Après le premier test, les animaux du groupe test sont exposés à l'ammoniac pendant 4 jours. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$ SD.



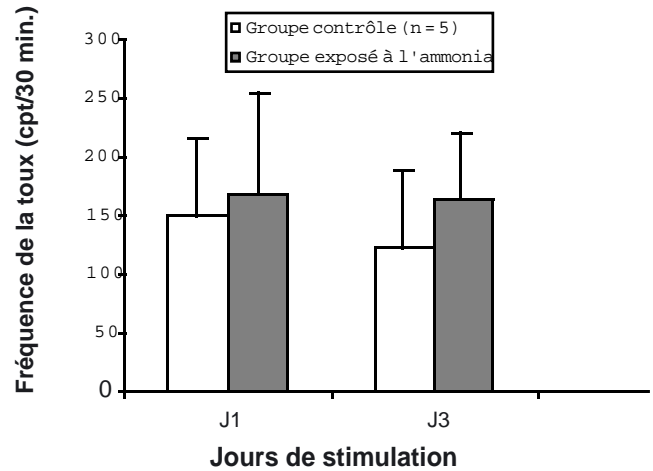
\* indique une différence significative par rapport à la valeur de base (J1).

o indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe sous ammoniac pour les valeurs correspondantes au même jour de stimulation.

**Figure 3** - Effet de l'ammoniac à la concentration de 30 ppm sur la toux induite par l'acide citrique chez le porc.

Les porcelets ont subi deux tests de provocation de la toux à deux jours d'intervalle (J1, J3).

Dans le groupe test, les animaux ont été exposés pendant 24 heures précédant le deuxième test de provocation de la toux.



### 3. DISCUSSION

L'ammoniac est un gaz irritant classiquement considéré comme un gaz tussigène. Chez le cheval, la toux peut être déclenchée par des concentrations en ammoniac comprises entre 17 et 30 ppm (KATAYAMA *et al.*, 1995). Chez le porc, cet effet a été décrit chez des animaux soumis à des concentrations importantes de 100 ppm et plus (STOMBAUGH *et al.*, 1969 et DRUMMOND *et al.*, 1980). Paradoxalement, l'ammoniac, à une concentration de 30 ppm, inhibe le réflexe de la toux chez des animaux exposés 4 jours (MOREAUX et GUSTIN, 1999a). Cet effet, confirmé par le présent travail, avait permis de formuler des

**Tableau 1** - Effet d'une exposition à l'ammoniac à la concentration de 30 ppm pendant 48 heures sur la concentration en substance P dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire et trachéal (BAL, TAL) ainsi que dans les fragments de muqueuse trachéale et bronchique.

	BAL (pg/10 ml)	TAL (pg/10 ml)	Muqueuse trachéale (pg/100 mg muqueuse)	Muqueuse bronchique (pg/100 mg muqueuse)
<b>Groupe contrôle</b>	21,22 $\pm$ 18,91 (n = 4)	48,60 $\pm$ 19,69 (n = 5)	189,60 $\pm$ 88,45 (n = 4)	189,32 $\pm$ 140,39 (n = 4)
<b>Groupe test</b>	113,10 $\pm$ 91,93 * (n = 4)	121,21 $\pm$ 21,10 *** (n = 4)	80,24 $\pm$ 62,02 * (n = 4)	107,77 $\pm$ 35,1 (n = 4)

La substance P a été extraite des liquides de lavage et de la muqueuse, puis dosée par une méthode RIA. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD.

\* : indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe test (\*: p<0.05; \*\*\*:p<0,0001).

hypothèses quant aux mécanismes d'action de ce gaz. Par ailleurs, sur le plan pratique, il est important d'établir une relation entre l'effet inhibiteur et la concentration en ammoniac.

Notre hypothèse formulée pour expliquer l'effet à la fois tussigène et inhibiteur du réflexe de la toux, se manifestant en fonction des concentrations, repose sur l'action possible de ce gaz sur la fibre-C. Celles-ci sont des neurones non myélinisés innervant la muqueuse de l'arbre respiratoire. Localement, elles peuvent libérer des neuropeptides comme la substance P. Celle-ci joue des rôles multiples notamment en participant au déclenchement de l'inflammation neurogénique (BARNES, 1991). En outre, son action stimulante vis-à-vis des récepteurs périphériques (RAR's) connus pour leur capacité à déclencher le réflexe de la toux a été décrite chez plusieurs espèces dont l'homme et le lapin (MATSUMOTO *et al.*, 1993 et 1994). L'action stimulante de l'ammoniac sur l'activité neurophysiologique des fibres-C a été décrite (MATSUMOTO, 1988; NAIDA *et al.*, 1996). En outre, les substances dites "irritantes" sont aussi considérées comme des agents stimulants de ces structures. Dès lors, la dégranulation de la fibre-C par l'ammoniac est une hypothèse plausible. Aux concentrations élevées, la substance P, libérée massivement, serait responsable de la toux. Lorsque les concentrations en ammoniac sont faibles, la dégranulation progressive des fibres-C réduirait leur sensibilité à des agents irritants comme l'acide citrique. Pour apporter des arguments expérimentaux à cette hypothèse, des dosages de substance P ont été réalisés à divers niveaux du tractus res-

piratoire. Les résultats du tableau 1 suggèrent que l'exposition à 30 ppm d'ammoniac pendant 4 jours provoque la libération de ce peptide ensuite soumis à l'activité catabolique de la neutral endopeptidase (NEP) et dans une moindre mesure de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) expliquant la réduction de la concentration en substance P dans les muqueuses.

En revanche, l'augmentation de la concentration en substance P dans les liquides de lavage pourrait s'expliquer par une réduction de l'activité protéolytique de la neutral endopeptidase (NEP) localisée dans l'épithélium (NADEL, 1994). Cet effet inhibiteur, décrit pour l'ozone, ne serait pas surprenant vu l'effet délétère de l'ammoniac sur l'épithélium trachéal (URBAIN *et al.*, 1996).

Quelles sont les conséquences pratiques de nos observations ? L'effet inhibiteur de ce gaz pourrait avoir des conséquences néfastes sur le développement des pathologies respiratoires vu le rôle de défense connu du réflexe de la toux. Toutefois, les résultats des figures 1 et 3 montrent que des concentrations relativement élevées, supérieures à 15 ppm, pendant plus de 24 heures sont nécessaires pour produire cet effet.

## REMERCIEMENT

Ce travail est subsidié par le Ministère de L'Agriculture (convention 5778A).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARNES P., 1991. In *The Lung*, 2<sup>e</sup> éd. vol 2, Scientific foundations
- BESKOW P., NORQVIST M., WALLGREN P., 1998. *Acta Vet. Scand.*, 39, 49-60.
- DRUMMOND J., CURTIS S., SIMON J., NORTON H., 1980. *J.Anim.Sci.*, 50, 1085-1091
- KATAYAMA Y., OIKAWA M., YOSHIOHARA T., KUWANO A., HOBOS S., 1995. *J.Equin. Sci.*, 6, 3, 99-104.
- MATSUMOTO S., 1988. *Neurosci.Lett.*, 90, 125-129.
- MATSUMOTO S., KANNO T., YAMASAKI M., NAGAYAMA T., TANNO M., SHIMIZU T., 1993. *J.Auton.Nerv.Syst.*, 43 (1), 17-25.
- MATSUMOTO S., YAMASAKI M., KANNO T. *et al*, 1994. *Lung*, 172 (1), 31-45.
- MOREAUX B., GUSTIN P., 1999a. *Journées Rech. Porcine en France*, 31, 361-364.
- MOREAUX B., BEERENS D., GUSTIN P., 1999b. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 22, (sous presse).
- NADEL J., 1994. In *Neuropeptides in Respiratory Medicine* ed Dekker.
- NAIDA A., GHOSH T., MATHEW O., 1996. *Respir. Physiol.*, 103, 11-17.
- NEMMAR A., GUSTIN P., DELAUNOIS A., BECKERS J-F., SULON J., 1998. *J. Pharmacol. Toxicol.Meth.*, 39, 109-115.
- STOMBAUGH D.P., TEAGUA H., ROLLER W., 1969. *J.Anim.Sci.*, 28, 844-847.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J-F. *et al*, 1993. *Vet.Res.*, 24, 503-514.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J-F., ANSAY M., 1994. *Am. J. Vet. Res.*, 55 (9), 1335-1340.
- URBAIN B., GUSTIN P., CHARLIER G., COIGNOUL F., LAMBOTTE J.L., 1996. *Vet. Res. Com.*, 20, 381-399.
- URBAIN B., MAST J., BEERENS D. *et al*, 1999. *Am.J.Vet. Res.*, 60 (9), 1055-1060.