

Influence d'une exposition aux poussières sur la composition cellulaire des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire chez le porc

B. URBAIN (1), J. MAST (2), B. GODDEERIS (2), M. ANSAY (1), P. GUSTIN (1)

(1) Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, Département de Pharmacologie et Toxicologie
Boulevard de Colonster, B41- B-4000 Liège, Belgique

(2) Katholieke Universiteit Leuven, Immunologie der Huisdieren - K. Mercierlaan 92 - B-3001 Heverlee, Belgique

avec la collaboration technique de D. Beerens et T.Q. Nguyen,

Influence d'une exposition aux poussières sur la composition cellulaire des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire chez le porc

Afin de rechercher les effets de l'inhalation chronique de poussières sur l'appareil respiratoire, des porcelets ont été exposés pendant 6 jours à des poussières de farine mises artificiellement en suspension dans l'air dans une chambre d'inhalation. Les effets biologiques des poussières ont été recherchés par l'analyse de la composition cellulaire des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire dans 4 groupes d'animaux soumis à différents niveaux de concentrations en poussières. Les concentrations en poussières inhalables dans les différents groupes étaient de 1 (groupe témoin), 4, 14 et 50 mg/m³. Les valeurs correspondantes de concentrations en poussières respirables étaient de 0,14 ; 0,54 ; 0,84 et 1,36 mg/m³. La muqueuse nasale ne semble pas altérée par l'exposition aux poussières, ainsi que le montre l'absence de modification de la composition cellulaire du liquide de lavage nasal. En revanche, dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, le nombre de cellules totales est significativement augmenté déjà aux plus faibles concentrations (4 mg/m³) et s'explique par une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires. Aux concentrations plus élevées, le nombre de macrophages alvéolaires et de lymphocytes dans le liquide de lavage sont significativement augmentés. En conclusion, l'exposition de porcs pendant 6 jours à des concentrations en poussières susceptibles d'être rencontrées en porcherie ne provoque pas d'irritation des cavités nasales. Par contre, les poussières s'avèrent pouvoir provoquer une stimulation de l'immunité pulmonaire non spécifique, et de l'inflammation pulmonaire chronique selon les niveaux d'exposition.

Chronic effects of dust exposure on the cellular composition of the liquid used to wash the nasal cavity and the broncho-alveoli in pigs

To assess the chronic effects of dust inhalation on the respiratory tract, piglets were exposed during a period of 6 days to concentrations of dust from feed flour. Dust was put into suspension artificially in the air of an inhalation chamber. The biological effects of dust exposure were evaluated by analyzing the cellular composition of nasal (NAW) and broncho-alveoli (BAW) washes. Four experimental groups were formed using animals exposed to the following inhalable dust concentrations : 1 (control), 4, 14 and 50 mg/m³. The corresponding respirable dust concentrations were 0,14 ; 0,54 ; 0,84 and 1,36 mg/m³. The nasal mucosa did not appear to be altered by exposure to dust as was seen by the lack of effect of dust exposure on the composition of NAW. In contrast, total cells counts in BAW were shown to be increased even at the lowest dust concentration (4 mg/m³). This was explained by high alveolar macrophage counts. In the group exposed to the highest dust concentrations the number of alveolar macrophages and lymphocytes in the washes were significantly increased. It is concluded that inhalation for 6 days of dust from feed flour at concentrations likely to be encountered in the farm situation does not provoke nasal cavity irritation. However, dust appears to stimulate non-specific pulmonary immunity and chronic pulmonary inflammation according to the level of exposure.

INTRODUCTION

Les poussières figurent parmi les polluants de l'air les plus importants dans les porcheries. Elles proviennent de différentes sources telles les matières fécales séchées, l'aliment, les squames animales et les microorganismes. D'autres composants ont été identifiés tels des additifs alimentaires, des moisissures, du pollen, des acariens, des débris d'insectes, des minéraux, des endotoxines, des agents infectieux et des gaz comme l'ammoniac adsorbés aux particules. Les particules alimentaires sont plus grandes que les particules fécales et dès lors constituent la masse principale des poussières. Elles affectent principalement les voies respiratoires extra-thoraciques. Par contre, la petite taille des microorganismes et des poussières d'origine fécale et dermique permet à ce matériel d'atteindre davantage les voies respiratoires profondes et les alvéoles où il est susceptible de produire des effets néfastes importants (DONHAM, 1986; CARPENTER, 1986). Les poussières sont suspectées par les épidémiologistes d'être potentiellement pathogènes, au vu des corrélations étroites établies entre les concentrations en poussières dans les exploitations et la prévalence des maladies chez l'homme et l'animal (ROBERTSON et al, 1990; DONHAM et al, 1989).

Dans le but de rechercher les effets de l'inhalation de poussières sur l'appareil respiratoire, des porcelets ont été exposés pendant 6 jours à des poussières de farine mises artificiellement en suspension dans l'air dans une chambre d'inhalation. Les effets biologiques des poussières ont été recherchés par l'analyse de la composition cytologique des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux

Vingt-cinq porcelets Landrace Belge ont été sélectionnés pour cette étude. Les animaux ont été préalablement introduits, au poids de 10 kg, dans un local constitué d'un caillbotis surélevé (40 cm), dépourvu de litière et où le lisier était éliminé quotidiennement. Les animaux ont été nourris exclusivement avec des granulés. Ces conditions d'hébergement particulières visaient à maintenir à un niveau minimal les concentrations en poussières avant l'expérimentation.

1.2. Méthode d'exposition aux poussières

Chaque animal a été introduit, à un poids moyen de 17 ± 3 kg, dans une chambre d'exposition aux poussières décrite précédemment (URBAIN et al, 1996). Brièvement, il s'agit d'un isolateur d'une capacité de $1,9 \text{ m}^3$ où les conditions microclimatiques et la charge en polluants sont contrôlées. Une farine alimentaire commerciale a été utilisée comme source de poussières. Après tamisage pour éliminer les grosses particules, la farine a été introduite dans un réservoir cylindrique de 150 cm de hauteur connecté à une source d'air comprimé afin de produire des turbulences et un nuage de poussières. Ce dernier était entraîné dans l'isolateur par le

système de ventilation. Le débit d'air dans le réservoir, ainsi que la hauteur à laquelle le nuage de poussières peut s'en échapper pouvaient être modulés de façon à obtenir différents niveaux de concentrations en poussières dans l'isolateur.

Les concentrations en poussières inhalables ont été mesurées de manière gravimétrique à l'aide d'un échantillonneur d'air composé d'une cassette portant un filtre de polycarbonate et d'une pompe maintenant un débit constant de 2 L/min. Les filtres ont été pesés immédiatement avant et après l'échantillonnage et les concentrations en poussières exprimées en mg/m^3 . Les concentrations en poussières respirables ont été mesurées de manière indirecte à l'aide d'un appareil de mesure optique de poussière fine (TM digital μP respirable dust-measuring instrument) convertissant la mesure optique en valeur gravimétrique avec une sensibilité de $0,01 \text{ mg}/\text{m}^3$.

1.3. Protocole expérimental

Quatre groupes d'animaux ont été constitués. Les animaux du groupe témoin ($n=7$) ont séjourné dans l'isolateur sans être exposés aux poussières. Les groupes I, II et III ont été exposés à des niveaux de concentrations en poussières considérés comme faible, moyen et élevé par rapport aux concentrations enregistrées dans les porcheries. Les conditions d'exposition sont résumées au tableau 1. La durée d'exposition a été de 8 heures par jour pendant 6 jours. Les animaux ont subi un lavage nasal avant et après l'exposition. Ils ont ensuite été euthanasiés afin de prélever les poumons et de pratiquer un lavage broncho-alvéolaire.

Tableau 1 - Conditions expérimentales d'exposition aux poussières dans l'isolateur

Paramètres	Groupes			
	Témoin	I	II	III
Poussières inhalables mg/m^3	$1,0 \pm 0,2$ (5)	$4,4 \pm 2,4$ (8)	$14,1 \pm 9,7$ (10)	$51,6 \pm 28,6$ (4)
Poussières respirables mg/m^3	$0,14 \pm 0,09$ (5)	$0,54 \pm 0,22$ (8)	$0,87 \pm 0,52$ (10)	$1,36 \pm 0,74$ (4)

Les valeurs sont des moyennes \pm écart type.

Le nombre d'échantillons est indiqué entre parenthèses.

1.4. Lavage nasal

Le lavage nasal a été réalisé sur des porcelets anesthésiés en instillant dans chaque narine 2,5 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 Thoma. Les résultats ont été exprimés en leucocytes par millilitre de liquide récolté.

1.5. Lavage broncho-alvéolaire

Après le 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 %. Le liquide a été transvasé dans des tubes de polycarbonate et conservé sur glace à 4°C. 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.

1.6. Différenciation cellulaire par cytométrie de flux

Les différents types cellulaires présents dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ont été identifiés par l'analyse fluorocytométrique des cellules préalablement conjuguées à des anticorps monoclonaux. Des anticorps monoclonaux anti-CD14 spécifiques des macrophages porcins, anti-CD4 et anti-CD8 spécifiques des sous-populations de lymphocytes T porcins, produits sur hybridomes de souris et conjugués à la fluorescéine, ont été utilisés comme marqueurs spécifiques. Pratiquement, 100 µl de liquide de lavage sont incubés en présence de 20 µl d'une solution d'anticorps monoclonaux pendant 45 minutes à 4 °C. De façon à obtenir une suspension leucocytaire disponible pour l'analyse fluorocytométrique, les globules rouges sont ensuite éliminés par lyse à l'acide formique (600 µl à 0,12%) pendant 7 secondes. La réaction est stoppée par l'addition de 260 µl d'un tampon stabilisateur (Na₂CO₃ 56,6 mM; NaCl 248 mM; Na₂SO₄ 220 mM). Les leucocytes sont ensuite directement fixés par l'addition de 135 µl de paraformaldéhyde à 1%. La suspension cellulaire est alors analysée par un appareil FACSACN (Becton-Dickinson) qui permet de différencier, lors de l'interaction avec un rayon laser, les cellules en fonction de leur volume, de leur granularité et de leur fluorescence. Les proportions des différents types cellulaires identifiées, à savoir les polymorphonucléaires, les macrophages alvéolaires, les lymphocytes et leurs sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ ont été déterminés à l'aide d'un programme informatique WinMDI.

1.7. 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 ou par un test non paramétrique de Mann-Whitney quand les écarts-types étaient inégaux.

2. RÉSULTATS

2.1. Réponse clinique à l'inhalation de poussières

Aucun signe clinique spécifique n'a été observé dans les différents groupes. De la toux a été occasionnellement observée.

2.2. Effets de l'inhalation de poussières sur la composition du liquide de lavage nasal

L'exposition aux poussières n'a pas influencé la composition cellulaire du liquide de lavage nasal. Le nombre de leucocytes présents dans le liquide de lavage avant (jour 0) et après (jour 6) l'exposition variait respectivement de 15 x10³ à 901 x10³ et de 13 x10³ à 1611 x10³ cellules/ml. Les rapports entre le nombre de leucocytes après et avant l'exposition (jour 6/jour 0) dans les groupes témoins, I, II et III étaient respectivement: 1±0,8; 4,4±4,1; 3,9± 7,3 et 1±0,7. Dans tous les groupes, au moins 85% des leucocytes sont des polymorphonucléaires neutrophiles.

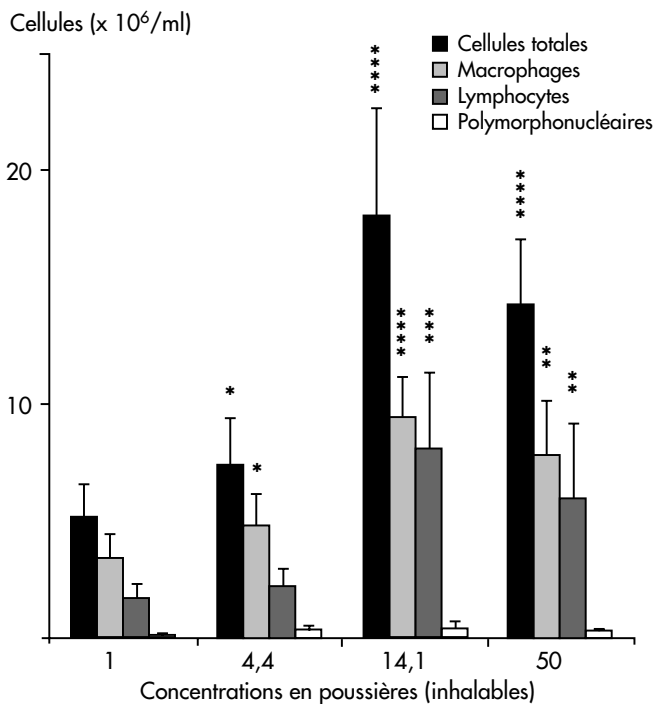
2.3. Effets de l'inhalation de poussières sur la composition du liquide de lavage broncho-alvéolaire

L'exposition aux poussières a provoqué une augmentation du nombre total de cellules déjà significative dans le groupe I. Les nombre total de cellules, exprimé en millions par millilitre, dans les groupes témoins, I, II et III étaient respectivement: 5,25 ± 1,32; 7,41 ± 2,08; 18,02 ± 4,65 et 14,34 ± 2,82. Les coefficients de corrélation (r) calculés entre le nombre total de cellules dans le liquide de lavage dans les groupes témoins, I et II, et les concentrations en poussières inhalables et respirables étaient respectivement de 0,912 et 0,703. La composition cellulaire du liquide de lavage broncho-alvéolaire est illustrée à la figure 1 (p 20). L'augmentation du nombre de cellules s'explique par une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires déjà significative dans le groupe I. Le nombre de lymphocytes n'augmente significativement qu'à partir des concentrations moyennes en poussières (groupe II). Le nombre de polymorphonucléaires augmente, mais de manière non significative. Une modification de la formule leucocytaire dans le liquide de lavage est observée dans les groupes II et III. Les macrophages alvéolaires représentent respectivement 65, 53 et 56% des leucocytes dans les groupes témoins, II et III, tandis que les valeurs correspondantes pour les lymphocytes sont 33, 43 et 41%. Les proportions de sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ n'ont pas été affectées par le traitement. Tous groupes confondus, les pourcentages de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, par rapport à la population lymphocytaire, étaient respectivement de 26,4 ± 9,1 et 50,6 ± 10,4 %.

3. DISCUSSION

Dans cette étude, les effets des poussières sur l'appareil respiratoire du porc ont été recherchés par l'analyse cyto-

Figure 1 - Nombre de cellules totales, de macrophages alvéolaires, de lymphocytes et de polymorphonucléaires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire chez des porcelets exposés à différentes concentrations en poussières. Les valeurs sont des moyennes accompagnées d'un écart type



* valeur significativement différente de celle enregistrée dans le groupe témoin (1 mg/m³)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

gique des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire après une exposition de 6 jours à des poussières d'origine alimentaire. La modulation des taux de poussières dans l'enceinte présente l'intérêt d'établir une relation dose-effet avec les poussières inhalables et respirables.

Dans les porcheries, les concentrations en poussières inhalables sont de l'ordre de 2 à 25 mg/m³. Les valeurs moyennes sont situées entre 2,8 et 7,4 mg/m³, tandis que des concentrations peuvent atteindre 24, voire 27 mg/m³ lors de la pesée des animaux ou lors de la distribution de farines (ATTWOOD et al, 1987; LARSSON et al, 1992, 1994). Les concentrations moyennes en poussières respirables sont de l'ordre de 0,2 à 1 mg/m³ (DONHAM, 1991; PICKRELL et al, 1993).

Les poussières peuvent induire des effets biologiques par des mécanismes très divers. Elles peuvent agir comme irritant physique, peuvent être porteuses de substances chimiques toxiques, d'agents pathogènes ou d'organismes commensaux. Etant de composition organique en milieu agricole, elles peuvent également être à l'origine de stimulations immunologiques. Peu d'études relatives à la toxicité des poussières sont disponibles. L'exposition de porcs à des concentrations en poussières inhalables de farine de

céréales de 200 et 250 mg/m³ pendant 1 à 6 semaines n'ont pas provoqué de signes cliniques ni de lésions histologiques des muqueuses respiratoires, ni de lésions pulmonaires (DOIG et WILLOUGHBY, 1971), pas plus que l'exposition pendant 3 à 4 semaines à des concentrations de 10 et 300 mg/m³ de poussières prélevées sur le sol de porcheries (CURTIS et al, 1975). Chez l'homme, 24 heures après l'inhalation d'extraits de poussières de céréales, le taux de lymphocytes dans le liquide de lavage nasal est significativement augmenté (CLAPP et al, 1993). Les éleveurs de porcs peuvent développer des signes d'inflammation des voies respiratoires ainsi que le montrent les augmentations des taux de cellules totales et de polymorphonucléaires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Leur système immunitaire est également activé comme l'illustrent les taux élevés d'anticorps dirigés contre les squames de porcs, les poussières et l'aliment pour porc (LARSSON et al, 1992). Une hyperréactivité bronchique est enregistrée chez les sujets n'ayant jamais subi d'exposition, lorsqu'ils sont introduits pendant 5 heures dans une porcherie où les concentrations en poussières varient de 9 à 14 mg/m³ (MALMBERG et LARSSON, 1993). Dans une expérience similaire, LARSSON et al (1994) enregistrent des augmentations significatives du nombre de macrophages alvéolaires, de polymorphonucléaires, et de lymphocytes dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire 22 heures après l'exposition aux poussières.

Dans nos conditions expérimentales, l'exposition aux poussières ne semble pas provoquer d'irritation de la muqueuse nasale. En revanche, l'exposition à de faibles concentrations (4,4 mg/m³ en poussières inhalables) est déjà suffisante pour provoquer une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Cet effet cellulaire est probablement le résultat d'une stimulation de l'immunité non spécifique participant à la clairance pulmonaire. L'exposition à de plus fortes concentrations en poussières résulte en une accumulation cellulaire plus importante des macrophages alvéolaires et des lymphocytes. La présence de ces derniers suggère le développement d'un processus inflammatoire chronique. L'inflammation aigüe, dont l'absence est établie par le nombre constant de polymorphonucléaires au 6^{ème} jour de l'exposition, pourrait toutefois se développer plus tôt au cours de ce processus inflammatoire pulmonaire et ne pas avoir été détectée en raison de la durée d'exposition (6 jours). Les répercussions sur l'immunité pulmonaire ont également été recherchés par l'analyse des sous populations de lymphocytes T. Cependant, l'exposition aux poussières ne semble pas modifier les proportions de lymphocytes T-helper (CD4+) ou T-supresseur (CD8+). Enfin, à titre d'information, la valeur de concentration maximale en poussières recommandée par les hygiénistes est de 10 mg/m³ pour une durée d'exposition de 8 heures (HEALTH AND SAFETY EXECUTIVE, 1992), une valeur qui peut paraître élevée au vu de nos résultats.

CONCLUSIONS

L'exposition de porcs pendant 6 jours à des concentrations

en poussières susceptibles d'être rencontrées en porcherie ne provoque pas d'irritation des cavités nasales. Par contre, les poussières s'avèrent pouvoir provoquer une stimulation de l'immunité pulmonaire non spécifique, et de l'inflammation pulmonaire selon les niveaux d'exposition.

REMERCIEMENTS

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

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ATTWOOD P., BROUWER R., RUIGIWAARD P., VERSLOOT P., DE WIT R., HEEDERIK D., BOLEIJ J.S.M., 1987. *Am. Ind. Hyg. Associ. J.*, 48, 745-751.
- CARPENTER G.A., 1986. *J. Agric. Engng. Res.*, 33, 227-241.
- CLAPP W.D., THORNE P.S., FREES K.L., ZHANG X., LUX C.R., SCHWARTZ D. A., 1993. *Chest*, 104, 825-830.
- CURTIS S.E., ANDERSON C.R., SIMON J., JENSEN A.H., DAY D.L., KELLEY K.W., 1975. *J. Anim. Sci.*, 41, 735-739.
- DOIG D.A., WILLOUGHBY R.A., 1971. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 159, 1353-1361.
- DONHAM K.J., 1986. *Am. J. Ind. Med.*, 10, 205-220.
- DONHAM K.J., HAGLIND P., PETERSON Y., RYLANDER R., BELIN L. Br. J., 1989. *Ind. Med.*, 46, 31-37.
- DONHAM J.D., 1991. *Am. J. Vet. Res.*, 52, 1723-1730.
- HEALTH and SAFETY EXECUTIVE, 1992. HSE Guidance Note EH/4092. HMSO
- LARSSON K., EKLUND A., MALMBERG P., BEIN L., 1992. *Chest*, 101, 767-774.
- LARSSON K., EKLUND A., HANSSON L.O., ISAKSSON B.M., MALMBERG P., 1994. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150, 973-977
- MALMBERG P., LARSSON K., 1993. *Eur. Resp. J.*, 6, 400-404.
- PICKRELL J.A., HEBER A.J., MURPHY J.P., HENRY S.C., MAY M.M., NOLAN D., OEHME F.W., GILLEPSIE J.R., SCHONEWEIS D., 1993. *Vet. Hum. Toxicol.*, 35, 421-428.
- ROBERTSON J.F., WILSON D., SMITH W.J., 1990. *Anim. Prod.*, 50, 173-182.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1994. *Am. J. Vet. Res.*, 55, 1335-1340.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J. F., BEERENS D., MICHEL O., NICKS B., ANSAY M., 1996. *Vet. Res.*, 27.