
MÉTHODOLOGIE DES ESSAIS DE TOXICITÉ PAR INHALATION CHEZ LE CHIEN ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Audrey, Annie DUPRAT

Née, le 18 avril 1981 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Directeur de thèse : **Mme le Professeur Martine KOLF-CLAUW**

JURY

PRESIDENT :

M. Christian VIRENQUE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Martine KOLF-CLAUW

M. Hervé LEFEBVRE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur Christian VIRENQUE
Professeur de l'Université Paul Sabatier de Toulouse
Service d'Anesthésiologie.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommages respectueux.

Madame le Professeur Martine KOLF-CLAUW
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Service de Pharmacie et Toxicologie.

En remerciement de l'attention qu'elle a portée à notre travail.
Avec toute notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur Hervé LEFEBVRE
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Service de Physiologie et Thérapeutique.

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.
Sincères remerciements.

**A ma mère,
Pour ton amour, ta générosité et ton soutien sans faille que tu m'apportes
chaque jour.
Merci de m'avoir aidée à réaliser mon rêve d'enfant.**

**A mon père,
Pour la fierté que je lis dans tes yeux quand tu me regardes.**

**A ma sœur Leslie et à sa petite Luna,
Pour la tendresse que vous m'apportez malgré la distance.**

**A ma Manue,
Pour ton amitié qui m'a aidée durant mon parcours.**

**A Enzo, Darling et Chloé,
Qui m'ont donné envie de faire ce métier.**

**A Max, mon si fidèle et affectueux compagnon à 4 pattes,
Que tu restes le plus longtemps possible à nos côtés.**

**A Billy, Dixy, Paloma, Wolf, Caramel, Lucas et les autres,
Qu'ils puissent trouver paix et sérénité dans l'autre monde.**

**A Antoine ♥, mon rayon de soleil,
Merci d'avoir toujours été à mes côtés durant certaines étapes difficiles.
Que tu trouves, à travers cet ouvrage, un modeste témoignage de tout
l'amour que j'ai pour toi.**

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES ILLUSTRATIONS (TABLEAUX)..... | 6 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS (FIGURES)..... | 7 |
| INTRODUCTION..... | 9 |
| <u>PREMIERE PARTIE : PHYSIOPATHOLOGIE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE DU CHIEN</u> | 10 |
| 1. HISTORIQUE : MORBIDITE ET MORTALITE | 10 |
| 2. ANATOMIE DU SYSTEME RESPIRATOIRE DU CHIEN | 11 |
| 2.1. REGION NASO-PHARYNGEE | 13 |
| 2.1.1. Le nez externe | 14 |
| 2.1.2. Les cavités nasales..... | 14 |
| 2.1.3. Les sinus paranasaux | 15 |
| 2.1.4. Le larynx | 16 |
| 2.2. REGION TRACHEO-BRONCHIQUE ET BRONCHIOLES | 18 |
| 2.2.1. La trachée | 18 |
| 2.2.2. Les bronches et bronchioles | 18 |
| 2.3. REGION PULMONAIRE..... | 19 |
| 3. HISTOLOGIE DU SYSTEME RESPIRATOIRE DU CHIEN | 22 |
| 3.1. CONDUITS AERIFERES..... | 22 |
| 3.2. PARENCHYME PULMONAIRE..... | 22 |
| 4. ROLES DU SYSTEME RESPIRATOIRE | 25 |
| 4.1. ROLES RESPIRATOIRES | 25 |
| 4.1.1. Portion conductrice..... | 25 |
| 4.1.2. Echanges gazeux..... | 26 |
| 4.2. ROLES DE PROTECTION CONTRE LES AGENTS TOXIQUES | 27 |
| 4.2.1. Mécanismes de défense non spécifique | 27 |
| 4.2.1.1. Au niveau de la région nasale | 27 |
| 4.2.1.2. Au niveau de la région trachéo-bronchique..... | 28 |
| 4.2.1.3. Au niveau de la région pulmonaire | 28 |
| 4.2.1.4. Rôle des réponses réflexes..... | 29 |
| 4.2.1.5. Métabolisation des xénobiotiques | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.2. Mécanismes de défense spécifique..... | 30 |
| 4.3. AUTRES ROLES | 31 |
| 4.3.1. Rôles olfactif et phonateur | 31 |
| 4.3.2. Production et libération de médiateurs et d'agents pharmacologiques ... | 32 |
| 5. PHYSIOLOGIE ET MECANIQUE RESPIRATOIRES..... | 32 |
| 6. CLASSIFICATION ET DEVENIR DANS L'ORGANISME DES XENOBIOTIQUES | |
| INHALES..... | 33 |
| 6.1. GAZ ET VAPEURS..... | 36 |
| 6.1.1. Classification..... | 36 |
| 6.1.1.1. Asphyxiants | 36 |
| 6.1.1.2. Irritants..... | 36 |
| 6.1.2. Devenir des gaz et vapeurs inhalés..... | 37 |
| 6.1.2.1. Influence de la solubilité..... | 38 |
| 6.1.2.1.1. Cas des gaz très hydrosolubles | 38 |
| 6.1.2.1.2. Cas des gaz possédant une solubilité intermédiaire.. | 39 |
| 6.1.2.1.3. Cas des gaz très insolubles | 39 |
| 6.1.2.2. Influence du métabolisme par les tissus respiratoires | 39 |
| 6.1.2.3. Influence des coefficients de partition..... | 40 |
| 6.2. PARTICULES ET AEROSOLS..... | 41 |
| 6.2.1. Influence de l'anatomie du système respiratoire sur le dépôt des | |
| particules..... | 42 |
| 6.2.2. Influence du modèle respiratoire sur le dépôt des particules | 43 |
| 6.2.3. Influence du mode de flux de l'air sur le dépôt des particules..... | 43 |
| 6.2.4. Les caractéristiques des particules qui influencent leur dépôt | 44 |
| 6.2.4.1. Solubilité et hygroscopie | 44 |
| 6.2.4.2. Charge électrostatique | 44 |
| 6.2.4.3. Forme..... | 45 |
| 6.2.4.4. Taille ou diamètre..... | 45 |
| 6.2.5. Les mécanismes de dépôt..... | 46 |
| 6.2.5.1. L'interception | 47 |
| 6.2.5.2. L'impaction inertielle..... | 47 |
| 6.2.5.3. La sédimentation gravitationnelle | 48 |
| 6.2.5.4. La diffusion de Brownian | 49 |
| 6.2.5.5. La précipitation électrostatique..... | 49 |
| 6.2.6. Bilan : lieu et mode de dépôt des particules en fonction de leur diamètre | |
| aérodynamique | 50 |
| 6.2.7. Mesure du dépôt des particules dans le système respiratoire..... | 53 |
| 6.2.7.1. Microscopique..... | 53 |
| 6.2.7.2. Histochimique | 53 |
| 6.2.7.3. Radioisotopique | 53 |
| 6.2.8. Mécanismes de clairance des particules | 54 |
| 6.2.8.1. Clairance naso-pharyngée..... | 54 |
| 6.2.8.2. Clairance trachéo-bronchique | 55 |
| 6.2.8.3. Clairance alvéolaire..... | 55 |
| 6.3. CAS DES ATMOSPHERES MIXTES..... | 56 |

| | |
|---|-----------|
| <u>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA TOXICITE</u> | |
| <u>PAR INHALATION : MODALITES</u> | 57 |
| 1. MECANISMES DE TOXICITE | 57 |
| 1.1. TOXICITE DIRECTE..... | 58 |
| 1.2. ACTIVATION METABOLIQUE | 58 |
| 1.3. TOXICITE MEDIEE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE | 59 |
| 1.4. INTERACTIONS ENTRE LES XENOBIOTIQUES | 60 |
| 2. LES DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DE LA TOXICITE DES | |
| XENOBIOTIQUES AERIENS AU NIVEAU DU SYSTEME RESPIRATOIRE | 60 |
| 2.1. LES ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES CONTROLEES..... | 60 |
| 2.2. LES ETUDES REALISEES EN EXPERIMENTATION ANIMALE..... | 61 |
| 2.3. LES METHODES <i>IN VITRO</i> | 63 |
| 3. DIFFERENTES ESPECES ANIMALES UTILISEES EN TOXICOLOGIE PAR | |
| INHALATION ET DOSE | 64 |
| 3.1. LES ESPECES ANIMALES UTILISEES | 64 |
| 3.1.1. Rongeurs | 64 |
| 3.1.1.1. Rat | 65 |
| 3.1.1.2. Hamster..... | 65 |
| 3.1.1.3. Cobaye..... | 65 |
| 3.1.2. Lagomorphes | 66 |
| 3.1.3. Primates..... | 66 |
| 3.1.4. Chiens | 66 |
| 3.2. DOSE..... | 67 |
| 3.2.1. Définition de la dose | 67 |
| 3.2.1.1. Différences entre les termes <i>concentration</i> et <i>dose</i> | 67 |
| 3.2.1.2. Dose interne et dose biologique effective..... | 68 |
| 3.2.2. Détermination de la dose..... | 68 |
| 3.2.3. La loi de Haber | 69 |
| 3.2.3.1. Influence de la concentration et du temps d'exposition..... | 69 |
| 3.2.3.2. Influence de la nature de l'agent toxique | 69 |
| 3.2.4. Influence des paramètres respiratoires sur la dose | 70 |
| 4. GENERATION ET ANALYSE DE L'ATMOSPHERE | 72 |
| 4.1. GENERATION DE L'ATMOSPHERE | 72 |
| 4.1.1. Production des atmosphères non particulaires : gaz et vapeurs | 72 |
| 4.1.2. Production des atmosphères particulaires | 73 |
| 4.1.2.1. Production des aérosols à partir des liquides | 74 |
| 4.1.2.2. Production des aérosols à partir des solides | 77 |
| 4.2. ANALYSE DE L'ATMOSPHERE..... | 79 |
| 4.2.1. Analyse des atmosphères non particulaires..... | 79 |
| 4.2.2. Analyse des atmosphères particulaires | 79 |
| 5. INSTALLATIONS EXPERIMENTALES ET TYPES D'EXPOSITION | 81 |
| 5.1. EXPOSITION DU CORPS ENTIER : ENCEINTE CONFINEE | 82 |
| 5.1.1. Conception des chambres d'inhalation..... | 82 |
| 5.1.2. Systèmes d'exposition statiques ou dynamiques | 83 |
| 5.1.2.1. Systèmes statiques..... | 83 |

| | |
|---|----|
| 5.1.2.2. Systèmes dynamiques..... | 83 |
| 5.1.3. Inconvénients de l'exposition du corps entier | 85 |
| 5.2. SYSTEMES D'EXPOSITION LIMITEES AU NEZ OU A LA TETE | 86 |
| 5.3. METHODES ALTERNATIVES | 86 |

TROISIEME PARTIE : ESSAIS TOXICOLOGIQUES ET CONSEQUENCES89

1. DETERMINATION DE LA TOXICITE AIGUE, A DOSES REPETEES (ETUDE SUR 14 OU 28 JOURS), SUBCHRONIQUE (ETUDE SUR 90 JOURS) ET CHRONIQUE PAR INHALATION.....89

| | |
|---|----|
| 1.1. CONNAISSANCES REQUISES | 89 |
| 1.2. DEFINITIONS..... | 90 |
| 1.3. PRINCIPE DE LA METHODE..... | 91 |
| 1.4. MODE OPERATOIRE | 91 |
| 1.4.1. Conditions d'hébergement et d'alimentation..... | 91 |
| 1.4.2. Equipement..... | 91 |
| 1.4.3. Conditions expérimentales | 92 |
| 1.4.3.1. Concentration d'exposition..... | 92 |
| 1.4.3.2. Durée d'exposition | 92 |
| 1.4.3.3. Période d'observation..... | 93 |
| 1.4.4. Mesures des propriétés physiques | 93 |
| 1.4.5. Examens cliniques | 93 |
| 1.4.6. Anatomicopathologie | 94 |
| 1.4.6.1. Autopsie générale..... | 94 |
| 1.4.6.2. Histopathologie | 95 |
| 1.5. RESULTATS ET RAPPORT | 95 |
| 1.5.1. Traitement des résultats | 95 |
| 1.5.2. Evaluation des résultats..... | 95 |
| 1.5.3. Rapport..... | 96 |
| 1.5.3.1. Conditions expérimentales..... | 96 |
| 1.5.3.2. Données concernant l'exposition | 96 |
| 1.5.3.3. Données concernant les animaux | 97 |
| 1.6. SECURITE DU PERSONNEL AU COURS DES ESSAIS DE TOXICITE PAR INHALATION | 97 |

2. LES REACTIONS DU SYSTEME RESPIRATOIRE SUITE A L'INHALATION D'AGENTS TOXIQUES.....98

| | |
|---|-----|
| 2.1. PHYSIOPATHOLOGIE DES REPONSES TOXICOLOGIQUES AU NIVEAU DU SYSTEME RESPIRATOIRE | 98 |
| 2.1.1. Lésion, régénération et réparation | 99 |
| 2.1.2. Réponse naso-pharyngée à la lésion..... | 99 |
| 2.1.3. Réponse des conduits aérifères à la lésion | 100 |
| 2.1.4. Réponse du parenchyme pulmonaire à la lésion | 101 |
| 2.1.4.1. Lésion épithéliale | 101 |
| 2.1.4.1.1. Simple réparation..... | 101 |
| 2.1.4.1.2. Lésion compliquée et réparation..... | 102 |
| 2.1.4.2. Lésion endothéliale | 102 |
| 2.1.4.3. Lésion interstitielle | 102 |

| | |
|---|------------|
| 2.2. LES PRINCIPALES REponses LESIONNELLES AU NIVEAU DU SYSTEME RESPIRATOIRE..... | 103 |
| 2.2.1. Inflammation pulmonaire..... | 103 |
| 2.2.2. Irritation de l'appareil respiratoire | 103 |
| 2.2.3. Oedème pulmonaire..... | 104 |
| 2.2.4. Fibrose pulmonaire | 105 |
| 2.2.5. Emphysème | 107 |
| 2.2.6. Asphyxie et suffocation | 107 |
| 2.2.7. Réponse allergique..... | 108 |
| 2.2.8. Cancer pulmonaire..... | 108 |
| 2.3. EFFETS DES TOXIQUES SUR LES DEFENSES PULMONAIRES | 109 |
| 2.3.1. Dysfonctionnement de la clairance muco-ciliaire | 109 |
| 2.3.2. Effets sur les activités fonctionnelles et biochimiques des macrophages alvéolaires | 110 |
| 2.3.3. Compétence immunologique et susceptibilité aux maladies infectieuses | 111 |
| | |
| 3. LES METHODES D'EVALUATION DE LA TOXICITE UTILISEES LORS DES ETUDES PAR INHALATION | 111 |
| 3.1. ETUDE DE LA FONCTION PULMONAIRE | 111 |
| 3.2. LAVAGE PULMONAIRE..... | 116 |
| | |
| 4. ESTIMATION DU RISQUE A PARTIR DES ESSAIS TOXICOLOGIQUES..... | 117 |
| | |
| | |
| CONCLUSION..... | 120 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 121 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS (TABLEAUX)

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients des différentes méthodes d'évaluation de la toxicité par inhalation | 62 |
| Tableau 2 : Comparaison des paramètres respiratoires du chien et de l'homme | 70 |
| Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents types d'exposition utilisés chez le chien | 81 |
| Tableau 4 : Tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients des différents types d'exposition possibles en toxicologie par inhalation chez le chien | 88 |
| Tableau 5 : Définition des volumes et capacités pulmonaires | 112 |
| Tableau 6 : Différents tests de la fonction pulmonaire | 113 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS (FIGURES)

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Appareil respiratoire du chien | 12 |
| Figure 2 : Modèle de compartimentation du tractus respiratoire | 13 |
| Figure 3 : Coupe transversale des cornets nasaux du chien. Vue rostrale | 14 |
| Figure 4 : Coupe transversale des cornets nasaux du chien | 15 |
| Figure 5 : Coupe médiane de la face du chien. La partie osseuse du septum nasal a été retirée | 15 |
| Figure 6 : Coupe médiane du larynx du chien | 16 |
| Figure 7 : Coupe médiane de la tête du chien. Vue médiale | 17 |
| Figure 8 : Poumon gauche du chien. Vues latérale et médiale | 19 |
| Figure 9 : Poumon droit du chien. Vues latérale, médiale et caudale | 20 |
| Figure 10 : Microphotographie électronique à balayage du moulage des bronches du chien. (15x) | 21 |
| Figure 11 : Microphotographie électronique à balayage du moulage d'un sac alvéolaire de chien. (229x) | 21 |
| Figure 12 : Diagramme présentant l'interface entre les cellules épithéliales de type I et les cellules endothéliales capillaires | 23 |
| Figure 13 : Schéma représentant le revêtement alvéolaire et la barrière air-sang | 24 |
| Figure 14 : Diagramme de représentation du devenir possible des xénobiotiques inhalés : les possibilités de dépôt, d'absorption, de distribution et d'excrétion | 35 |
| Figure 15 : Diagramme de représentation des bifurcations du système respiratoire pour illustrer l'augmentation de l'aire de coupe transversale des conduits aérifères | 42 |
| Figure 16 : Mécanismes de dépôt des particules dans le système respiratoire | 46 |
| Figure 17 : Représentation schématique du phénomène d'interception des particules | 47 |

| | |
|--|-----|
| Figure 18 : Représentation schématique du phénomène d'impaction inertielle des particules | 48 |
| Figure 19 : Représentation schématique du phénomène de sédimentation gravitationnelle des particules | 49 |
| Figure 20 : Représentation schématique du phénomène de diffusion de Brownian des particules | 49 |
| Figure 21 : Dépôt régional des aérosols inhalés en fonction de la taille particulaire chez l'homme | 51 |
| Figure 22 : Paramètres influençant le dépôt des particules dans le système respiratoire | 52 |
| Figure 23 : Représentation schématique des systèmes de production des aérosols liquides les plus communément utilisés | 76 |
| Figure 24 : Représentation schématique des systèmes de production des aérosols solides les plus communément utilisés | 78 |
| Figure 25 : Schéma du filtre utilisé pour la collecte des particules contenues dans un aérosol et de l'impacteur en cascade utilisé pour déterminer la distribution de la taille particulaire d'un aérosol | 80 |
| Figure 26 : Augmentation et diminution de la concentration dans un système fermé | 85 |
| Figure 27 : Diagramme simplifié représentant les différentes possibilités suite à une lésion tissulaire ou cellulaire | 98 |
| Figure 28 : Représentation schématique de l'œdème pulmonaire | 105 |
| Figure 29 : Représentation schématique des volumes et capacités pulmonaires | 113 |
| Figure 30 : Description schématique des différentes étapes de l'estimation du risque | 118 |

INTRODUCTION

L'homme et les animaux entrent continuellement en contact avec les différents agents physiques et chimiques qui constituent leur environnement par l'intermédiaire de trois voies principales. Ces agents peuvent se déposer sur leur peau ou leur pelage (exposition cutanée), ils peuvent être déglutis après contact avec la cavité orale (exposition orale), enfin ils peuvent être inhalés par passage par le nez ou la bouche (exposition par inhalation). Par le biais de l'inhalation, l'appareil respiratoire est donc constamment exposé à un grand nombre de toxiques aériens présents dans l'environnement.

La pollution de l'air constitue un problème majeur de santé publique. Les sources de pollution sont très diverses : foyers domestiques (par exemple, par les poêles à gaz ou à bois, les appareils de chauffage, les systèmes d'air conditionné, les produits d'entretien de la maison...) ou lieux de travail (par exemple, l'exposition à l'amiante ou à la silice), usines, véhicules automobiles, tabagisme, pulvérisations et vaporisations de produits phytosanitaires (120, 152, 167)...

Dans ce contexte, une législation a été développée afin de protéger l'homme. Elle fait intervenir des processus de contrôles adéquats des lieux de travail et de l'environnement afin de prévenir toute exposition excessive. Ainsi, il est nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués dans le développement des maladies provoquées par l'inhalation de toxiques. De plus, il est primordial d'établir le profil toxicologique des nouvelles molécules rencontrées dans l'environnement. Des études expérimentales, souvent réalisées sur des animaux, représentent la seule façon d'obtenir ces données.

L'approche toxicologique par inhalation utilisant des modèles animaux est la plus complexe techniquement, difficile à contrôler et coûteuse de toutes les branches de la toxicologie. Elle se définit par l'étude des effets nocifs des molécules aérogènes susceptibles d'être inhalées et d'atteindre ainsi le système respiratoire (257). Cette branche de la toxicologie repose sur la morphologie spéciale de l'organe cible, la technologie de l'exposition et la collaboration avec d'autres disciplines (physiologie, épidémiologie...) (142, 211, 212).

De nos jours, des pressions financières, scientifiques et éthiques ont abouti au développement de méthodes alternatives aux méthodes habituelles de toxicité par inhalation (comme par exemple les méthodes *in vitro*). Nous ne ferons que les évoquer dans cette thèse.

L'objectif de cette thèse est de réaliser une synthèse bibliographique de la méthodologie des essais de toxicité par inhalation chez le chien. Tout d'abord, la physiopathologie de l'appareil respiratoire du chien nous permettra de comprendre le devenir des toxiques inhalés. Après un bref aperçu des différents mécanismes de toxicité des agents aériens et des méthodes d'évaluation de cette toxicité par inhalation, nous aborderons les modalités des études expérimentales réalisées chez le chien. Enfin, nous nous intéresserons aux essais toxicologiques et aux diverses réponses lésionnelles observées au niveau de l'appareil respiratoire.

PREMIERE PARTIE :

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE DU CHIEN

1. HISTORIQUE : MORBIDITE ET MORTALITE (159)

Les conséquences de l'inhalation d'air contaminé sont connues depuis longtemps. La conscience et l'inquiétude du public concernant la nature et l'importance des risques pour la santé associés à l'exposition à des agents chimiques aériens ont varié au cours de l'histoire. La présence ubiquitaire d'agents chimiques aériens dans l'environnement soulève de nombreux problèmes puisque la pollution atmosphérique affecte à la fois la santé de l'homme et des animaux et peut contribuer à de la mortalité (213).

Il y a plus de cent ans de cela, il a été noté que l'air expiré contenait moins de poussière que l'air inhalé, démontrant ainsi que des substances aériennes étaient éliminées de l'air inhalé et déposées dans le système respiratoire.

Initialement, les lésions pulmonaires causées par des agents chimiques étaient associées à certaines professions ou activités. En 1713, le physicien italien Bernardino Ramazzini décrit les lésions rencontrées au niveau des poumons des mineurs (196). Au vingtième siècle, il apparut évident que les lésions pulmonaires causées par des agents aérogènes n'étaient pas uniquement limitées à certaines activités.

Les années 50 et 60 furent une période durant laquelle le public devint de plus en plus conscient de la pollution environnementale par les produits chimiques industriels comme le témoigne le livre de Rachel Carson *Silent Spring* (40).

Des épisodes de pollution atmosphérique majeurs se sont produits au cours de l'histoire. Ils avaient essentiellement pour origine la libération accidentelle de quantités massives de substances extrêmement dangereuses dans l'environnement à partir de déversements chimiques, d'explosions industrielles, de feux ou d'accidents impliquant des camions ou des voitures ferroviaires transportant ces produits chimiques. Ces incidents dramatiques ont conduit à une meilleure connaissance du phénomène de pollution atmosphérique et de ses sources, des effets délétères sur la santé de l'homme et des animaux.

Face à ce problème majeur de santé publique, l'homme a pris conscience de la nécessité de développer des stratégies afin d'éliminer de tels risques. Des directives ont été élaborées notamment par le National Research Council (organisme américain) afin de mettre en place des niveaux d'exposition de substances aériennes dangereuses déclenchant des situations d'urgence (174). Des systèmes sont de plus en plus développés afin de contrôler les concentrations de polluants dans l'environnement ou sur les lieux de travail. De nos jours, la mise en place de ces multiples systèmes de contrôle a permis de diminuer la fréquence des épisodes de pollution de l'air dans les pays développés.

La communauté scientifique est désormais préoccupée par la libération de substances dans l'environnement à de très faibles niveaux qui pourraient entraîner des effets à long terme. Pour certains de ces agents chimiques, des niveaux seuils n'ont pas encore été trouvés. De plus, de nouveaux polluants sont introduits de façon régulière dans l'environnement. L'identification et la connaissance de l'association entre un tel polluant et l'état pathologique résultant demeure un challenge pour le toxicologiste. Cette problématique a conduit les scientifiques à développer des essais de toxicologie par inhalation faisant appel à des modèles animaux. Le chien sera la principale espèce étudiée dans cette thèse.

Avant de mettre en place une étude expérimentale de toxicité par inhalation chez le chien, il est essentiel de connaître l'anatomie, la fonction et la physiologie du système respiratoire de cette espèce. En effet, ceci permet de clarifier certaines des complexités auxquelles le toxicologiste doit faire face.

2. ANATOMIE DU SYSTEME RESPIRATOIRE DU CHIEN (74, 160, 187, 207)

La figure 1, située à la page suivante, est une vue d'ensemble de l'anatomie de l'appareil respiratoire du chien.

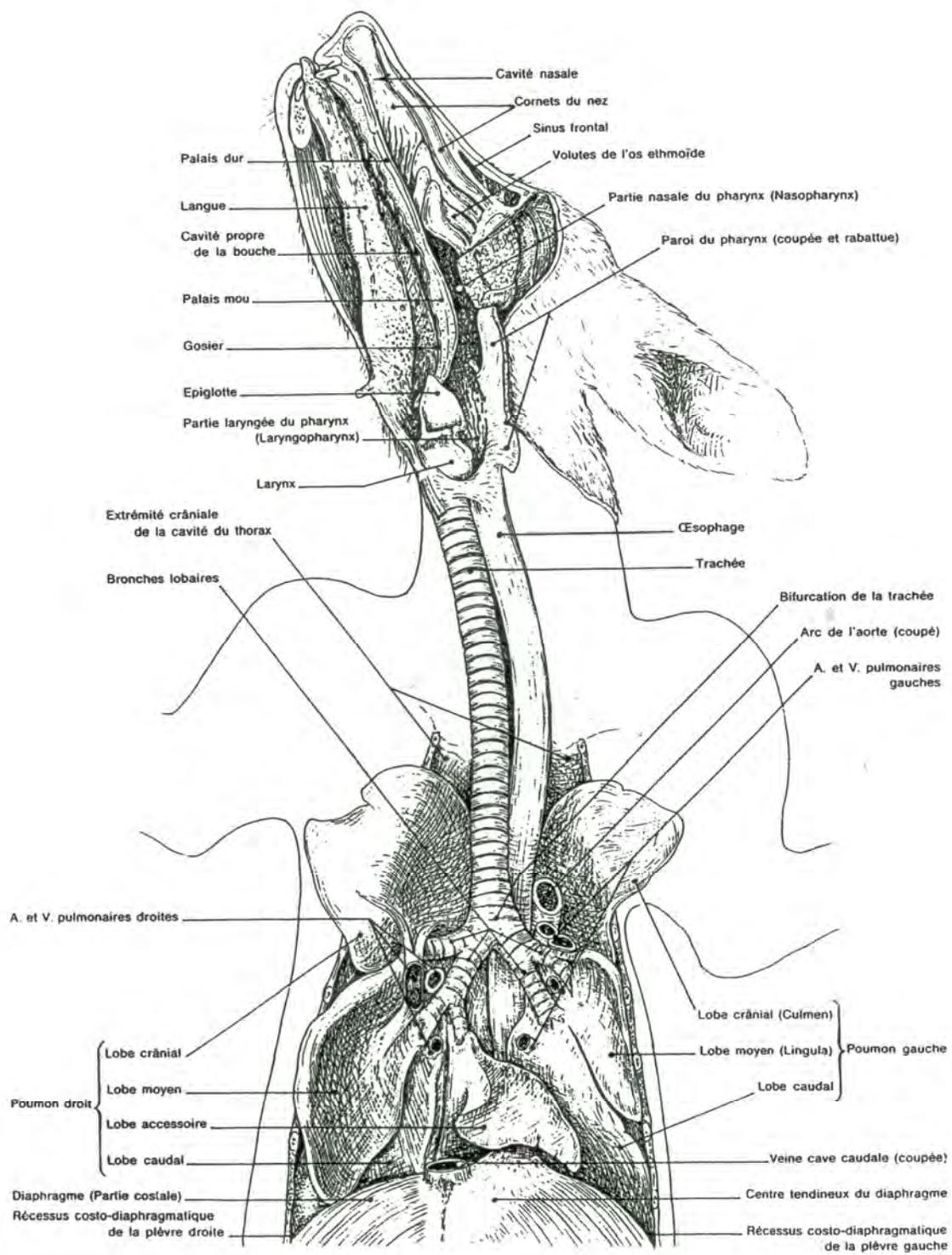


Figure 1 : Appareil respiratoire du chien (16).

En raison de sa complexité, le système respiratoire est fréquemment divisé en trois régions. Cette compartimentation est basée sur la structure anatomique et les fonctions physiologiques correspondantes attribuées à chacune de ces régions. Les manifestations toxiques observées au cours des essais sont différentes selon la nature du compartiment touché.

Ainsi, ces trois parties majeures sont les régions naso-pharyngée, trachéo-bronchique et pulmonaire. Elles sont représentées de façon simplifiée dans la figure 2 ci-dessous.

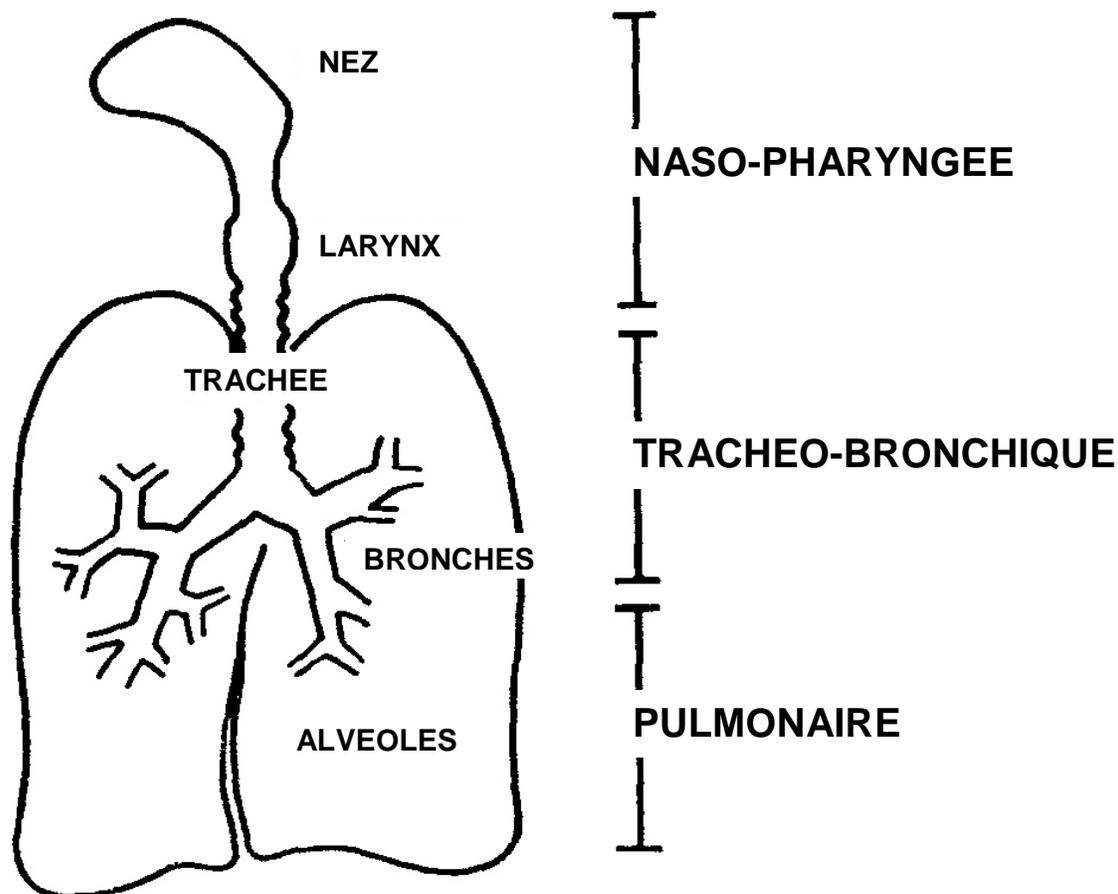


Figure 2 : Modèle de compartimentation du tractus respiratoire.

2.1. REGION NASO-PHARYNGEE (219, 220)

Cette région correspond à la fraction la plus proximale du système respiratoire et constitue la première cible potentielle des substances aériennes.

2.1.1. Le nez externe

Le nez est la principale voie d'entrée de l'air et des substances aériennes dans le système respiratoire du chien.

La racine du nez constitue ce que l'on appelle le "stop" ; le chanfrein représente le dos du nez. Chez les carnivores domestiques, la pointe du nez n'est pas individualisée.

Le plan nasal du rostre est formé de la truffe. Elle est saillante, glabre et d'aspect chagrinée.

Contrairement au chat, la truffe du chien est en général pigmentée. Son humidité est permise par le liquide lacrymal et deux types de glandes (les glandes du septum nasal et les glandes nasales lacrymales).

Les ailes du nez bordent les narines dorso-médialement. Il s'agit de la paroi la plus cartilagineuse et la plus mobile des narines. Les narines constituent l'ouverture externe du vestibule nasal ; elles ont une forme allongée en virgule.

L'ostium naso-lacrymal est étroit et caché par le pli alaire. La majorité des chiens présentent un second ostium au niveau de la canine dans le méat moyen.

2.1.2. Les cavités nasales (195)

Les cavités nasales s'étendent des narines au pharynx. Elles sont séparées de la bouche par le palais osseux et cloisonnées sur le plan médian par le septum nasal.

Les volutes de l'éthmoïde les délimitent caudo-dorsalement du crâne. Les choanes, localisées ventralement à l'extrémité du septum nasal, assurent la communication avec le rhino-pharynx.

Comme le montrent les figures 3 et 4, chez le chien, les cornets nasaux sont complexes, ramifiés et membraneux. L'air passe au niveau de la moitié supérieure de la cavité nasale.

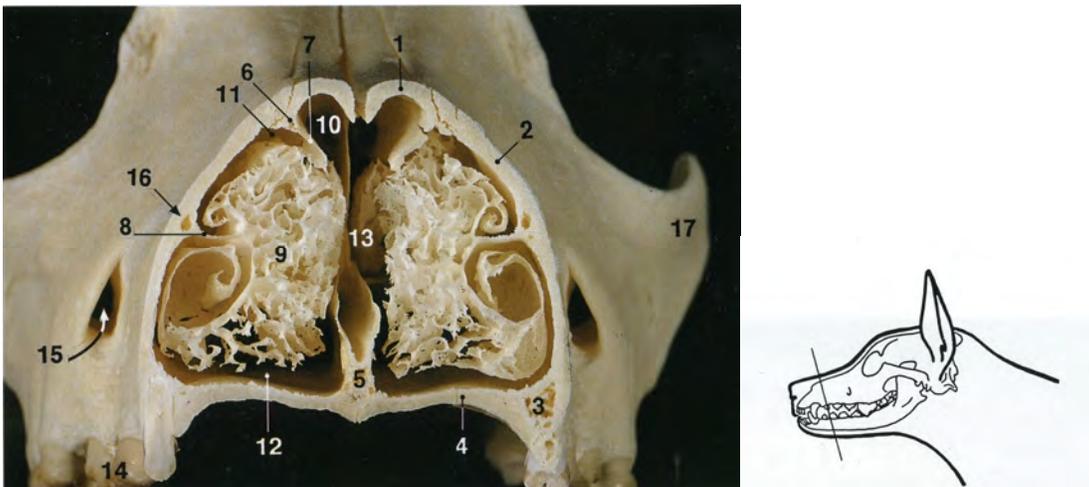


Figure 3 : Coupe transversale des cornets nasaux du chien. Vue rostrale (207).

1. Os nasal, 2. Corps du maxillaire, 3. Processus alvéolaire (Maxillaire), 4. Processus palatin (Maxillaire), 5. Vomer, 6. Crête éthmoïdale (Os nasal), 7. Cornet nasal dorsal, 8. Crête conchale (Maxillaire), 9. Cornet nasal ventral, 10. Méat nasal dorsal, 11. Méat nasal moyen, 12. Méat nasal ventral, 13. Méat nasal commun, 14. Troisième prémolaire supérieure, 15. Trou infra-orbitaire, 16. Canal lacrymal, 17. Arcade zygomatique.

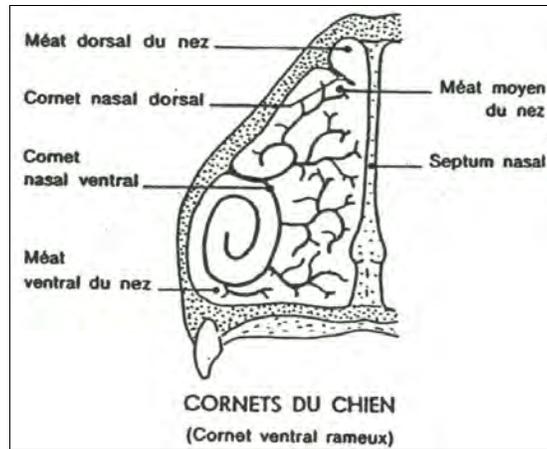


Figure 4 : Coupe transversale des cornets nasaux du chien (16).

2.1.3. Les sinus paranasaux

Ce sont des diverticules des cavités nasales dont le rôle n'a pas été complètement élucidé. Le chien possède des sinus maxillaires (qui se limitent à de simples récessus), sphénoïdes et frontaux.

La figure 5 ci-dessous représente les cornets nasaux et les sinus frontaux du chien.

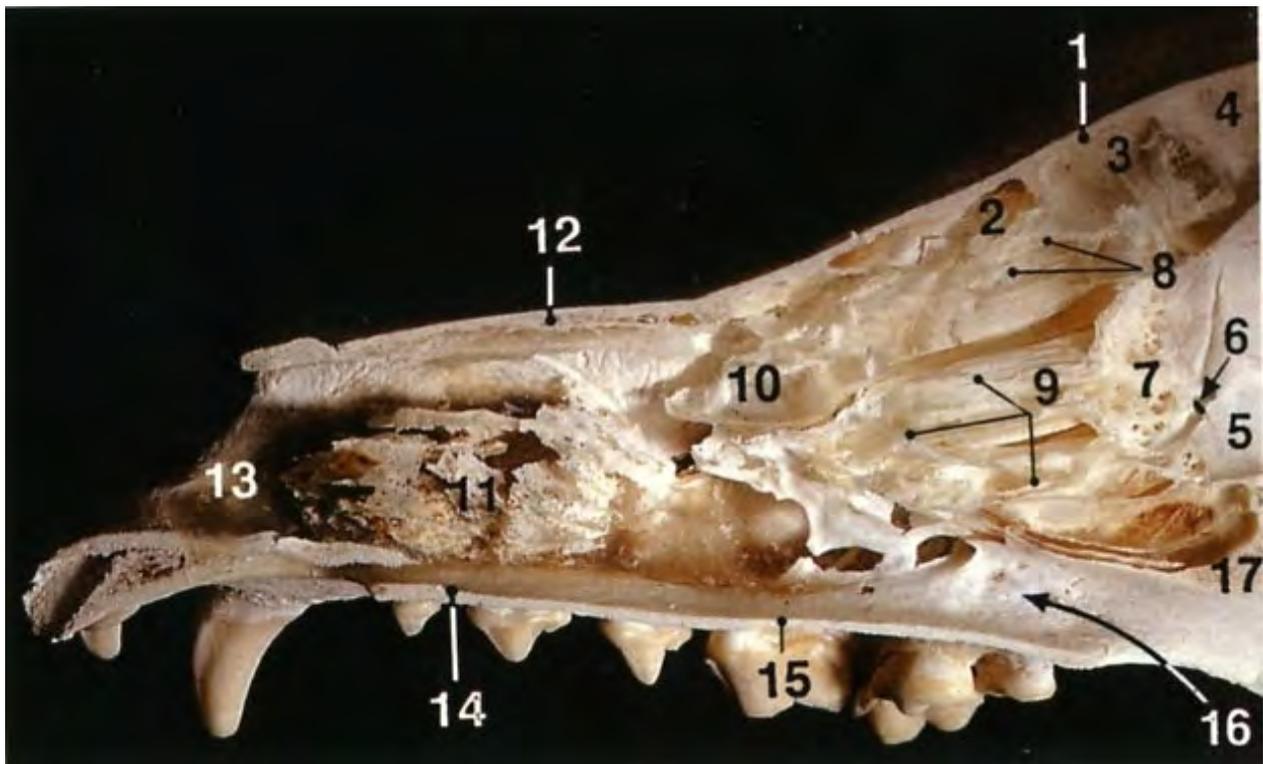


Figure 5 : Coupe médiane de la face du chien. La partie osseuse du septum nasal a été retirée (207). La légende est à la page suivante.

1. Os frontal, 2. Sinus frontal rostral, 3. Sinus frontal médial, 4. Sinus frontal latéral, 5. Aile (Os présphénoïde), 6. Trou ethmoïdal, 7. Lame criblée (Os othmoïde), 8. Volutes ethmoïdales ectoturbinales, 9. Volutes ethmoïdales endoturbinales, 10. Cornet nasal dorsal, 11. Cornet nasal ventral, 12. Os nasal, 13. Os incisif, 14. Processus palatin (Maxillaire), 15. Lame horizontale (Os palatin), 16. Méat naso-pharyngien, 17. Corps (Os présphénoïde).

2.1.4. Le larynx

Portion initiale de l'arbre aérophone, le larynx constitue la base anatomique de la région du cou (figure 6).

Cette boîte cartilagineuse déformable constitue le carrefour entre les voies digestive et respiratoire. Ses cartilages sont reliés entre eux par des articulations et des ligaments ou membranes souples et entourés par une musculature puissante.

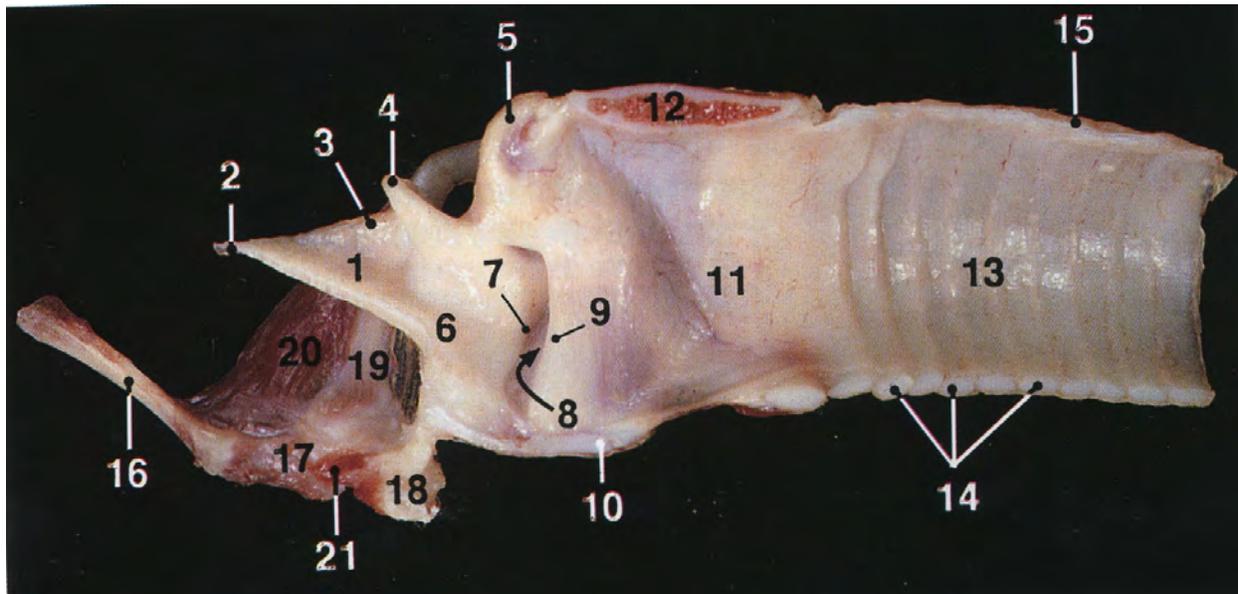


Figure 6 : Coupe médiane du larynx du chien (207).

1. Face laryngée (Epiglotte), 2. Apex (Epiglotte), 3. Pli ary-épiglottique, 4. Tubercule cunéiforme, 5. Tubercule corniculé, 6. Vestibule laryngé, 7. Pli vestibulaire, 8. Ventricule laryngé, 9. Pli vocal (Corde vocale), 10. Cartilage thyroïde, 11. Cavité infraglottique, 12. Lame du cartilage cricoïde, 13. Trachée, 14. Cartilages trachéaux, 15. Muscle trachéal, 16. Epihyoïde, 17. Ceratohyoïde, 18. Basihyoïde, 19. Thyrohyoïde, 20. Muscle ceratohyoïdien, 21. Muscle hyo-épiglottique.

Afin de récapituler l'anatomie naso-pharyngée du chien, voici une coupe médiane de la tête du chien (figure 7).

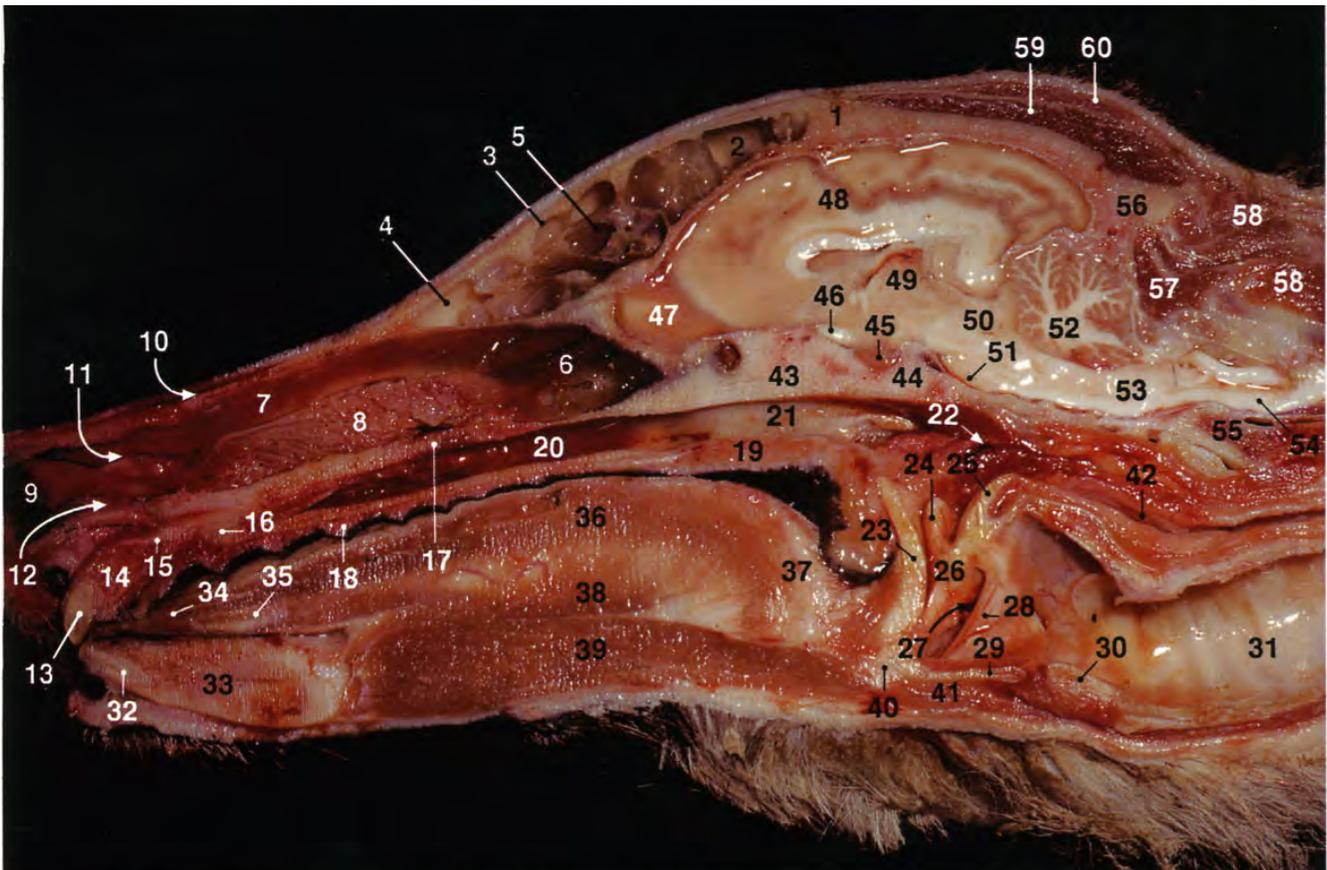


Figure 7 : Coupe médiane de la tête du chien. Vue médiale (207).

1. Os frontal, 2. Sinus frontal latéral, 3. Sinus frontal médial, 4. Sinus frontal rostral, 5. Volutes ethmoïdales ectoturbinales, 6. Volutes ethmoïdales endoturbinales, 7. Cornet nasal dorsal, 8. Cornet nasal ventral, 9. Pli alaire, 10. Méat nasal dorsal, 11. Méat nasal moyen, 12. Méat nasal ventral, 13. Incisive supérieure, 14. Os incisif, 15. Conduit incisif, 16. Cartilage voméro-nasal, 17. Vomer, 18. Palais dur, 19. Palais mou, 20. Méat naso-pharyngien, 21. Nasopharynx, 22. Ouverture pharyngée de la trompe auditive, 23. Cartilage épiglottique, 24. Processus cunéiforme (Cartilage aryténoïde), 25. Processus corniculé (Cartilage aryténoïde), 26. Pli vestibulaire, 27. Ventricule laryngé, 28. Pli vocal (Corde vocale), 29. Cartilage thyroïde, 30. Cartilage cricoïde, 31. Trachée, 32. Incisive inférieure, 33. Mandibule, 34. Pointe de la langue, 35. Lyssa, 36. Corps de la langue, 37. Racine de la langue, 38. Muscle génio-glosse, 39. Muscle génio-hyoïdien, 40. Basihyoïde, 41. Muscle sterno-hyoïdien, 42. Oesophage, 43. Os présphénoïde, 44. Os basisphénoïde, 45. Hypophyse, 46. Nerf optique (II), 47. Bulbe olfactif (Rhinencéphale), 48. Hémisphère (Cerveau), 49. Thalamus (Diencephale), 50. Collicules rostral et caudal (Mésencéphale), 51. Pont (Métencéphale), 52. Cervelet (Métencéphale), 53. Moelle allongée ("bulbe rachidien") (Myélocéphale), 54. Moelle épinière, 55. Dent (Axis), 56. Os occipital, 57. Muscle petit droit dorsal de la tête, 58. Muscle grand droit dorsal de la tête, 59. Muscle temporal, 60. Muscle occipital.

2.2. REGION TRACHEO-BRONCHIQUE ET BRONCHIOLES (93)

Au niveau de cette région, l'anatomie du chien ressemble étroitement à celle de l'homme.

Les conduits aérifères s'étendent de la trachée jusqu'aux bronchioles respiratoires.

Chez le chien, l'arbre trachéo-bronchique est de type monopodal, c'est-à-dire que les conduits sont longs avec de petites branches latérales qui quittent le conduit principal à un angle de 60°.

Les conduits aérifères ont une structure ramifiée, avec des générations successives de conduits aérifères. A chaque ramification, le nombre de conduits double par rapport à la génération précédente et les diamètres internes décroissent au fur et à mesure que l'on pénètre dans l'arbre bronchique. Par conséquent, la surface totale des conduits aérifères augmente progressivement depuis la trachée vers les conduits aérifères distaux.

2.2.1. La trachée

A l'entrée de la région trachéo-bronchique, l'extrémité proximale de la trachée est continue avec le larynx. Puis, la trachée s'étend distalement dans la cavité thoracique. Au niveau de la carène trachéale, elle bifurque pour former deux branches nommées bronches principales qui pénètrent dans les poumons droit et gauche.

La trachée est maintenue durant la respiration par des anneaux cartilagineux qui l'empêche de se collaber. Ce tube cartilagineux toujours béant sert à la conduction de l'air du larynx jusqu'aux bronches.

Chez les carnivores domestiques, la trachée est aplatie dorso-ventralement et les extrémités des anneaux sont reliées par une large paroi membranacée.

2.2.2. Les bronches et bronchioles

Elles constituent un système de conduits divisés et ramifiés succédant à la trachée et servant à la ventilation pulmonaire.

L'arbre bronchique, formé de l'ensemble de ces ramifications, supporte le parenchyme pulmonaire et détermine l'architecture des poumons.

Les deux bronches principales se divisent en bronches lobaires ou secondaires qui se divisent à nouveau en bronches segmentaires ou tertiaires. Ces dernières subissent de nombreuses ramifications jusqu'à obtenir les bronchioles. Celles-ci sont de deux types : les bronchioles terminales qui se ramifient pour donner les bronchioles respiratoires. Ces dernières communiquent avec les conduits alvéolaires. Les bronchioles terminales et respiratoires constituent les conduits non respiratoires les plus distaux.

Ainsi, lors de leur pénétration dans les poumons, les bronches se divisent sous forme de conduits de diamètres de plus en plus petits jusqu'à ce que le cartilage disparaisse et que les conduits ne soient composés que de muscle lisse et de tissu conjonctif lâche.

2.3. REGION PULMONAIRE

Elle constitue la région la plus distale et inclut les bronchioles respiratoires, les conduits alvéolaires, les sacs alvéolaires et les alvéoles.

Les poumons constituent un organe thoracique pair de nature parenchymateuse et présentent chez les chiens 3 lobes gauches et 4 lobes droits.

La surface des poumons est recouverte d'une plèvre viscérale. Les parois de la cavité pleurale sont recouvertes d'une membrane séreuse nommée plèvre pariétale.

Selon la classification de McLaughlin (151), les poumons des chiens sont de type II car ils possèdent une plèvre très fine, un septum interlobulaire pauvrement défini et ne présentent pas de lobulation secondaire.

Les caractéristiques anatomiques des poumons des chiens sont les suivants (203):

- Les veines pulmonaires sont minces avec une paroi principalement fibreuse
- Présence d'un cartilage et de glandes sous-muqueuses dans les bronches intra-pulmonaires
- Présence de bronchioles respiratoires
- Les scissures atteignent le hile situé en regard du tiers dorsal du quatrième espace intercostal.
- Les lobes crâniens sont très développés.

Les figures 8 et 9 représentent des photographies de poumons du chien.

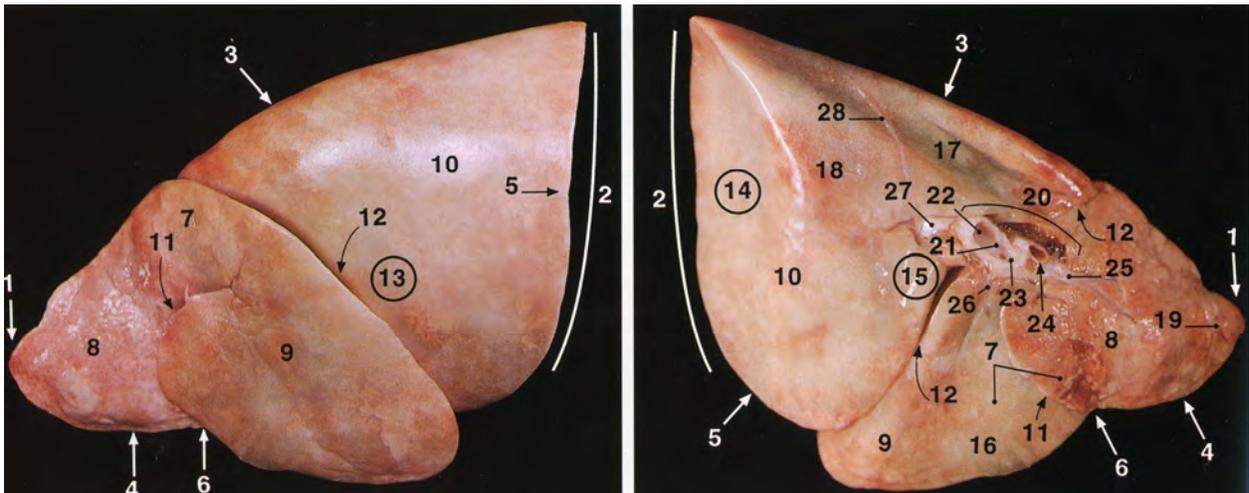


Figure 8 : Poumon gauche du chien. Vue latérale (à gauche) et vue médiale (à droite) (207).

1. Sommet du poumon, 2. Base du poumon, 3. Bord dorsal, 4. Bord ventral (Bord aigu), 5. Bord basal (Bord aigu), 6. Incisure cardiaque du poumon gauche, 7. Lobe crânial, 8. Partie crâniale (Lobe crânial), 9. Partie caudale (Lobe crânial), 10. Lobe caudal, 11. Scissure intralobaire, 12. Scissure interlobaire caudale, 13. Face costale, 14. Face diaphragmatique, 15. Face médiale, 16. Empreinte cardiaque, 17. Empreinte aortique, 18. Empreinte oesophagienne, 19. Empreintes de l'artère et de la veine thoraciques internes, 20. Hile du poumon, 21. Bronche principale (Poumon gauche), 22. Bronche lobaire caudale (gauche), 23. Bronche lobaire crâniale (gauche), 24. Artère pulmonaire gauche, 25. Rameau crânial (Veine pulmonaire du lobe crânial gauche), 26. Rameau caudal (Veine pulmonaire du lobe crânial gauche), 27. Veine pulmonaire du lobe caudal gauche, 28. Ligament pulmonaire.

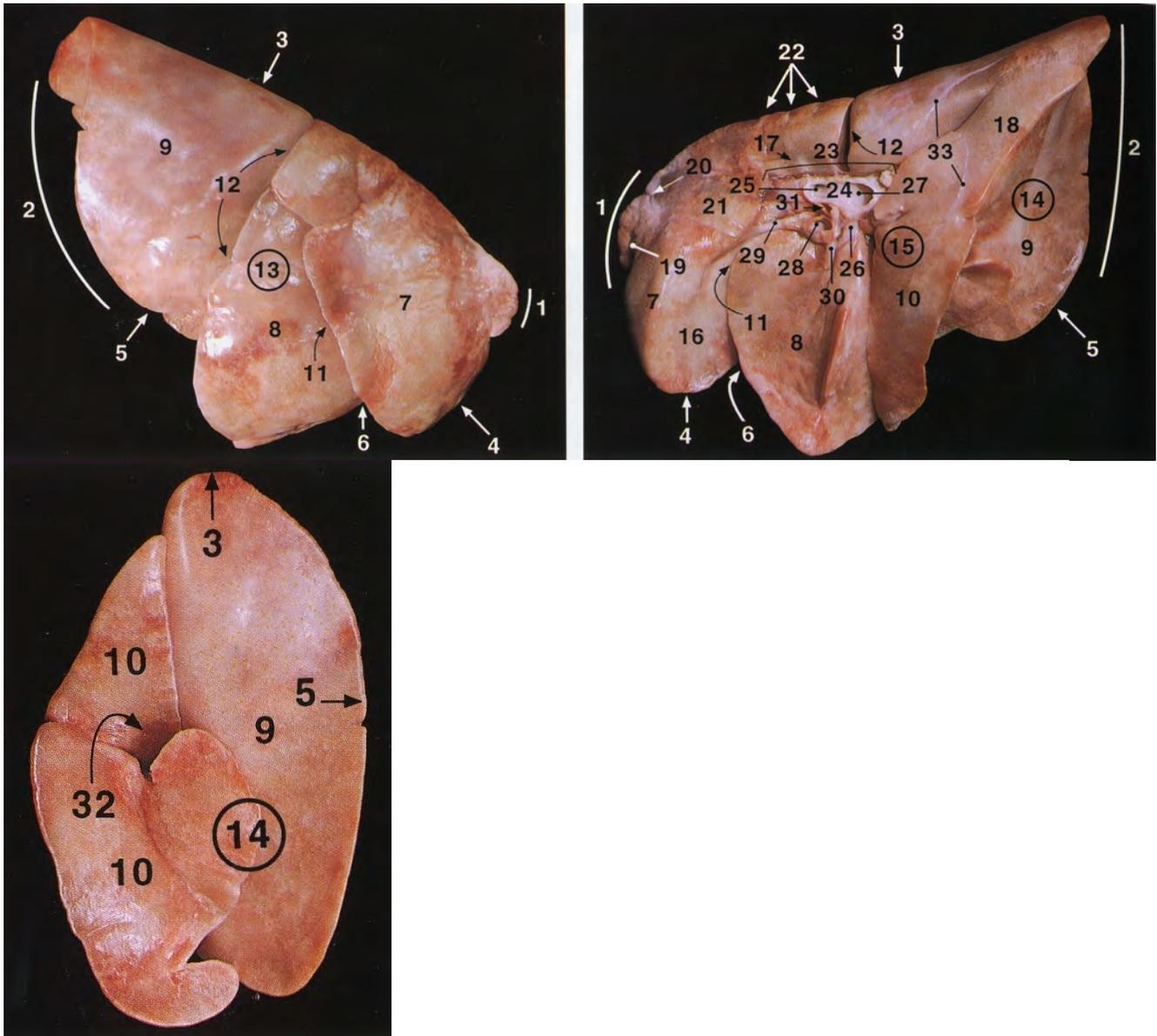


Figure 9 : Poumon droit du chien. Vue latérale (en haut à gauche), vue médiale (en haut à droite) et vue caudale (en bas) (207).

1. Sommet du poumon, 2. Base du poumon, 3. Bord dorsal, 4. Bord ventral (Bord mince), 5. Bord basal (Bord mince), 6. Incisure cardiaque du poumon droit, 7. Lobe crânial, 8. Lobe moyen, 9. Lobe caudal, 10. Lobe accessoire, 11. Scissure interlobaire crâniale, 12. Scissure interlobaire caudale, 13. Face costale, 14. Face diaphragmatique, 15. Face médiale, 16. Empreinte cardiaque, 17. Empreinte aortique, 18. Empreinte oesophagienne, 19. Empreinte de l'artère et de la veine thoraciques internes, 20. Empreinte de la veine costo-cervicale, 21. Empreinte de la veine cave crâniale, 22. Empreintes costales, 23. Hile du poumon, 24. Bronche principale (Poumon droit), 25. Bronche lobaire crâniale droite, 26. Bronche lobaire moyenne, 27. Bronche lobaire caudale droite, 28. Artère pulmonaire droite, 29. Rameau du lobe crânial (Artère pulmonaire droite), 30. Rameau du lobe moyen (Artère pulmonaire droite), 31. Veine pulmonaire, 32. Sillon de la veine cave caudale, 33. Ligament pulmonaire.

Les figures 10 et 11 sont des microphotographies réalisées chez le chien au niveau de la région pulmonaire.

Figure 10 :
Microphotographie
électronique à balayage du
moulage des bronches du
chien. (15x).
*Ramification
pseudodichotomique.*
(207).

1. Bronche, 2. Bronchioles, 3.
Alvéoles pulmonaires.

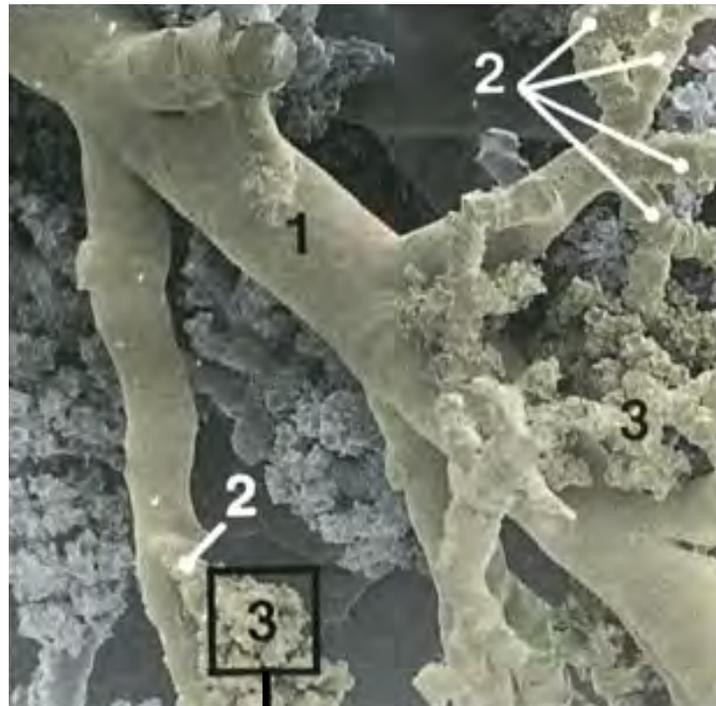
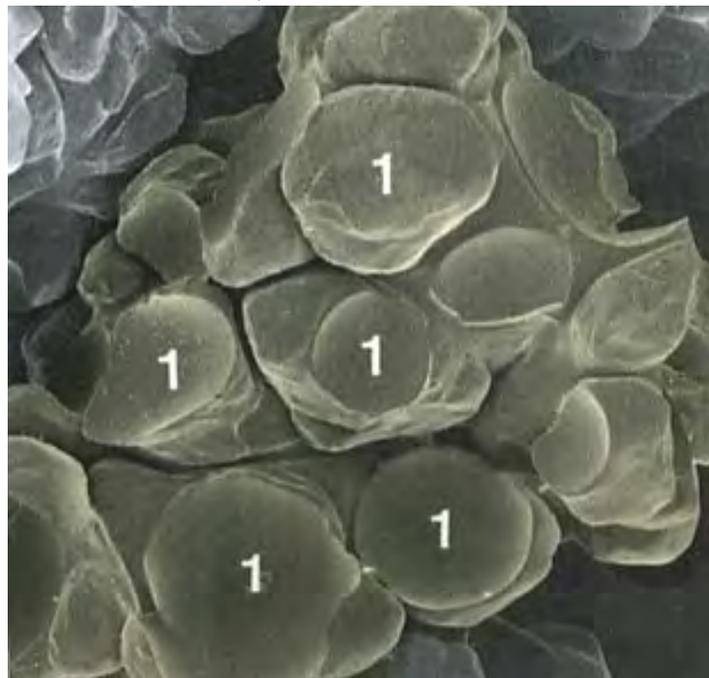


Figure 11 :
Microphotographie
électronique à balayage du
moulage d'un sac alvéolaire
de chien. (229x).
(207).

1. Alvéoles pulmonaires.



3. HISTOLOGIE DU SYSTEME RESPIRATOIRE DU CHIEN (233)

3.1. CONDUITS AERIFERES

La trachée et les bronches possèdent un épithélium pseudo-stratifié cilié. La muqueuse trachéale présente des glandes trachéales muqueuses ou séro-muqueuses. La muqueuse bronchique se compose de cellules séreuses et de cellules caliciformes ou à mucus.

Les cellules caliciformes ou à mucus produisent le mucus du tractus respiratoire qui recouvre l'épithélium d'une couche protectrice adhérente et viscoélastique et piège les polluants et les débris cellulaires.

Les cellules séreuses produisent un fluide dans lequel le mucus peut être dissous. Les cils du système respiratoire, qui battent de façon synchrone sous le contrôle du système nerveux central, déplacent continuellement la couche de mucus vers le pharynx, d'où elle est éliminée du tractus respiratoire par déglutition ou expectoration. On parle d'escalator muco-ciliaire.

Les bronchioles périphériques et terminales présentent un épithélium en colonne simple cilié avec des cellules de Clara (191, 192).

Les bronchioles respiratoires possèdent un épithélium simple cubique avec principalement des cellules de Clara et occasionnellement des cellules ciliées.

3.2. PARENCHYME PULMONAIRE (89)

Les cellules majoritaires du parenchyme pulmonaire sont les cellules épithéliales alvéolaires ou pneumocytes de type I et II, les cellules endothéliales pulmonaires, les cellules interstitielles et les macrophages alvéolaires.

Les pneumocytes composent l'épithélium alvéolaire et fonctionnent comme une barrière perméable qui limite les mouvements de molécules entre l'espace alvéolaire et l'interstitium.

Les cellules épithéliales alvéolaires de type I sont majoritaires et recouvrent l'essentiel de l'épithélium respiratoire. Ces petites cellules sont le siège de la diffusion des gaz et des petites molécules non ionisées. Elles possèdent une surface lisse et un cytoplasme très fin pauvre en organites, minimisant ainsi l'épaisseur de la barrière pour les échanges gazeux. La principale fonction de ces cellules est le maintien d'une barrière pour éviter la fuite de fluides et de protéines à travers la paroi alvéolaire vers les espaces aériens tout en permettant au gaz de traverser librement la barrière air-sang.

Les cellules épithéliales alvéolaires de type II sont plus épaisses et grandes et ont une forme cubique. Elles possèdent un cytoplasme abondant et présentent de nombreuses microvillosités qui augmentent leur surface. Les fonctions de ces cellules sont la synthèse, le stockage et la sécrétion du surfactant pulmonaire, un fluide de revêtement alvéolaire essentiel. Ce dernier possède une haute teneur en lipides et permet d'éviter l'atélectasie et le collapsus alvéolaire durant l'expiration qui conduiraient à une hypoxie et une diminution de la

compliance pulmonaire. Cette dernière est une mesure des propriétés élastiques des poumons. Elle se définit comme la relation qui unit la pression et le volume pulmonaires. Il s'agit de la variation de pression transpulmonaire (pression alvéolaire - pression pleurale) à développer pour créer une variation du volume pulmonaire.

Ainsi, ce film phospho-lipidique permet le maintien de la stabilité alvéolaire et de la fonction pulmonaire normale (96, 205). Les cellules de type II sont également les cellules souches ou précurseurs de l'épithélium alvéolaire et sont capables de proliférer et de se différencier en cellules de type I aboutissant de cette façon à une réépithélialisation de la paroi alvéolaire après une lésion pulmonaire. Enfin, ces cellules assurent le transport transépithélial de soluté pour limiter le volume ou réguler la composition du fluide alvéolaire. Elles peuvent également synthétiser des métabolites de l'acide arachidonique et des facteurs activateurs de plaquettes et métaboliser des xénobiotiques (46).

Les cellules endothéliales forment une barrière qui évitent la fuite excessive d'eau ou de macromolécules dans l'interstitium pulmonaire. Elles permettent le transport des gaz respiratoires, de l'eau et des solutés et possèdent des activités biochimiques (synthèse d'amines vasoactives, de prostaglandines, de peptides, de lipides, d'hormones...)

La figure 12 permet de nous rendre compte de la proximité qui existe entre les cellules épithéliales de type I et les cellules endothéliales au niveau de la barrière alvéolaire.

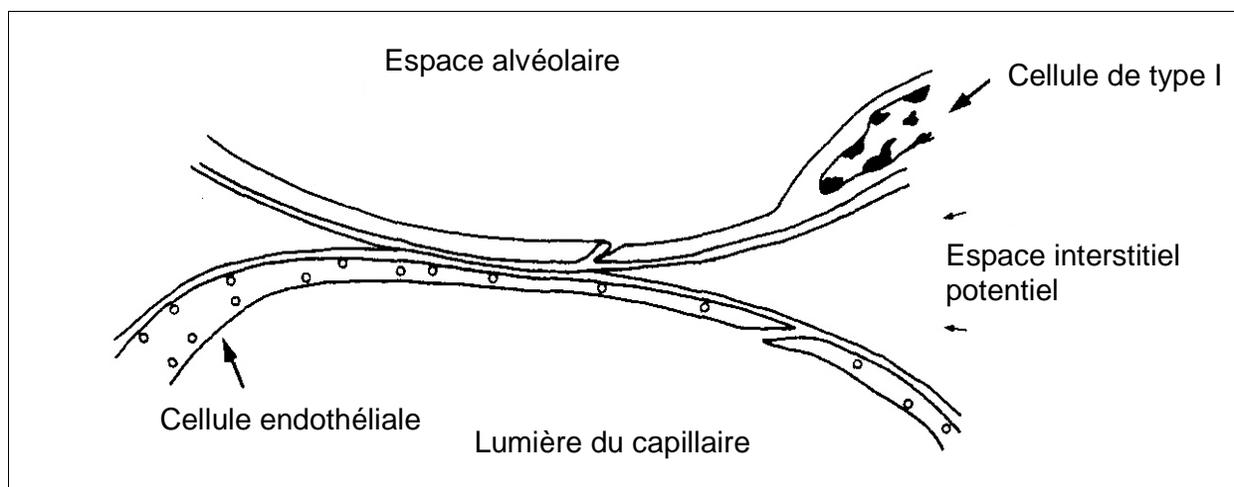


Figure 12 : Diagramme présentant l'interface entre les cellules épithéliales de type I et les cellules endothéliales capillaires (106).

L'interstitium est composé de tissu conjonctif élastique et de cellules interstitielles (fibroblastes). Des macrophages, lymphocytes, plasmocytes et mastocytes sont également présents.

Le collagène, les fibres élastiques et les protéoglycanes sont les constituants majeurs du tissu conjonctif pulmonaire (189, 200). On les rencontre dans l'interstitium alvéolaire mais aussi dans la plèvre et autour des conduits aérifères et des vaisseaux. Ils contribuent à l'intégrité structurale et fonctionnelle des poumons. Les fibres élastiques jouent un rôle crucial dans les propriétés mécaniques des poumons et dans la pathogenèse de l'emphysème et des maladies obstructives chroniques. Nous l'étudierons dans la troisième partie.

Les fibroblastes sont les principales cellules présentes dans l'interstitium. Ils maintiennent l'intégrité structurale des poumons en raison de leur localisation anatomique et de leur synthèse de collagène et d'autres composés de la matrice tels que la fibronectine. Les fibroblastes produisent également une variété d'enzymes dont la collagénase et d'autres facteurs tels que les prostaglandines qui peuvent moduler la fonction des autres types cellulaires. Les fibroblastes peuvent jouer un rôle dans les processus pathologiques qui entraînent une fibrose. Ceci sera abordé plus tard (3ème partie, paragraphe 2.2.4.).

On trouve des macrophages dans la lumière alvéolaire chez toutes les espèces (254). Il s'agit d'une grosse cellule nucléée présentant de longues expansions cytoplasmiques dont la fonction est de phagocyter et d'éliminer des matériaux exogènes présents dans cette région. Les macrophages alvéolaires ne sont pas fixés à la paroi de l'épithélium alvéolaire mais sont mobiles et jouent un rôle dans l'inflammation et les réponses immunitaires. Leur rôle dans la défense pulmonaire sera expliqué dans une prochaine partie (paragraphe 4.2.).

La figure 13 récapitule les différents constituants cellulaires présents au niveau du parenchyme pulmonaire.

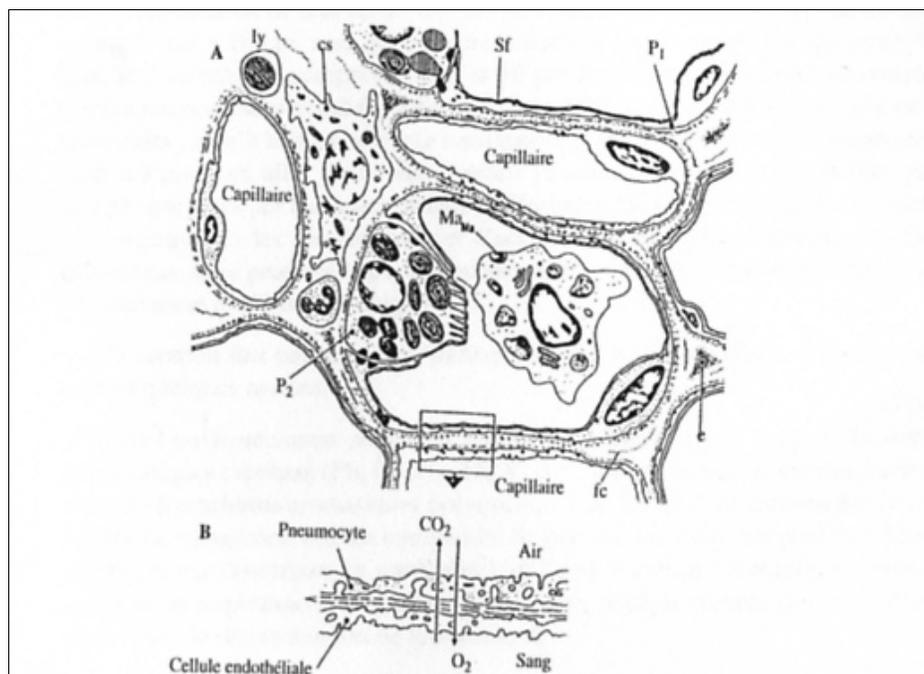


Figure 13 : Schéma représentant le revêtement alvéolaire (A) et la barrière air-sang (B) (60).

A. Revêtement alvéolaire formé par les pneumocytes I (P_1) et II (P_2). Présence d'un macrophage (Ma) dans la lumière. La cloison interalvéolaire renferme les capillaires, des cellules septales (cs), des lymphocytes (ly), des granuloctes (g), des fibres élastiques (c) et des fibres de collagène (fc). Le surfactant (Sf) est étalé à la surface des pneumocytes.

B. Barrière air-sang : les échanges gazeux entre l'air et le sang s'effectuent à travers les septa inter-alvéolaires constituées par les parois juxtaposées du capillaire et de l'alvéole.

4. ROLES DU SYSTEME RESPIRATOIRE (55)

Le système respiratoire possède de nombreuses fonctions, la plus importante de celles-ci étant l'échange de gaz qui se produit au niveau des poumons. Les autres fonctions incluent la protection contre les agents toxiques, la production et la libération d'hormones et de médiateurs et la biotransformation de xénobiotiques. L'appareil respiratoire permet aussi l'excrétion de toxiques absorbés par les poumons ou d'autres voies.

4.1. ROLES RESPIRATOIRES (50)

D'un point de vue fonctionnel, le système respiratoire peut se scinder en trois parties : une portion conductrice, une région respiratoire et un mécanisme de ventilation. Ces fonctions fournissent l'oxygène issu de l'air et élimine le dioxyde de carbone du torrent sanguin.

La portion conductrice du système est constituée du nasopharynx et de l'arbre trachéo-bronchique. Cette portion sert à transporter l'air inspiré au niveau de la région respiratoire des poumons. Durant ce transport, elle assure le réchauffement, l'humidification et la filtration de l'air. L'anatomie et les autres caractéristiques de cette région, telles que l'hétérogénéité cellulaire étudiée précédemment, affectent grandement la distribution et les effets toxiques des substances inhalées.

La portion respiratoire du système comprend le parenchyme pulmonaire dont la fonction majeure est l'échange gazeux.

Les constituants du système ventilatoire sont la cage thoracique, les muscles intercostaux, le diaphragme et le tissu conjonctif élastique des poumons qui agissent en synergie pour transporter l'air à l'intérieur de l'appareil respiratoire.

4.1.1. Portion conductrice

La région naso-pharyngée purifie l'air inspiré grâce à l'épithélium respiratoire pseudo-stratifié pourvu de cellules ciliées et à mucus (les grosses particules présentes dans l'air inhalé sont éliminées), le réchauffe grâce à ses plexus vasculaires sous-muqueux (adaptation de l'air inhalé à la température du corps) et enfin l'humidifie (saturation en vapeur d'eau) grâce à l'évaporation du mucus et du produit de sécrétion des glandes nasales. Cette humidification de l'air par l'épithélium respiratoire est essentielle au maintien des capacités olfactives, d'une respiration efficace avec échange de l'oxygène et du dioxyde de carbone et d'une activité ciliaire adéquate.

La structure des cornets nasaux affecte le dépôt des particules et la distribution des gaz inhalés dans la cavité nasale. Ceci sera étudié ultérieurement (paragraphe 6).

Le pharynx et le larynx agissent ensemble pour permettre le passage des aliments solides et des liquides tout en fournissant un espace suffisant pour permettre le passage de l'air durant la respiration.

Le larynx protège les voies aérophores par la fermeture de l'épiglotte lors de la déglutition pour éviter les fausses routes et par le réflexe de toux afin de rejeter les corps étrangers. De plus, il régule le débit respiratoire en modulant la quantité d'air inspiré et expiré grâce à sa déformabilité (le larynx est assimilé à une « troisième narine »).

4.1.2. Echanges gazeux (95, 177, 202)

Bien qu'il existe de considérables différences entre les espèces au niveau de l'anatomie macroscopique et microscopique du système respiratoire, les principes généraux impliqués dans les échanges gazeux sont identiques.

L'appareil respiratoire est constitué par l'ensemble des organes dévolus aux échanges gazeux entre le sang et le milieu extérieur permettant la restauration gazeuse du sang nommée hématoxe. Cette fonction principale des poumons prend place au niveau de l'ensemble de la surface alvéolaire (85). Dans cette région, la structure des poumons leur permet d'assurer ses rôles fondamentaux : apporter de l'oxygène à l'ensemble des organes et tissus de l'organisme et éliminer son produit de déchet le plus important, le dioxyde de carbone.

Trois processus sont impliqués pour assurer ce mécanisme : la ventilation, la perfusion et la diffusion des gaz à travers la barrière air-sang.

La ventilation est accomplie par le déplacement de l'air depuis le système respiratoire supérieur (passages nasaux et larynx) vers les conduits aérifères puis la zone alvéolaire.

Les poumons sont continuellement perfusés par le sang provenant du ventricule droit du cœur grâce à l'artère pulmonaire. Les poumons sont les seuls organes qui reçoivent, à n'importe quel moment donné, l'intégralité du débit cardiaque.

Les alvéoles constituent les principaux sites d'absorption des toxiques gazeux ou volatils. Elles sont séparées entre elles par une fine cloison occupée en grande partie par les capillaires pulmonaires afin de faciliter les échanges gazeux. La minceur de l'espace séparant l'air alvéolaire enrichi en oxygène du sang enrichi en dioxyde de carbone permet à l'hématoxe de s'effectuer (246, 247). Dans cette zone alvéolaire, l'oxygène et le dioxyde de carbone traversent la barrière air-sang par diffusion. Il en résulte que le sang veineux, qui est transporté jusqu'aux poumons à partir du cœur droit, libère le dioxyde de carbone et s'enrichit en oxygène.

Dans le but d'atteindre l'hémoglobine située dans les globules rouges, l'oxygène doit traverser les cellules épithéliales pulmonaires et leur membrane basale, l'interstitium, le cytoplasme et la membrane basale des cellules endothéliales capillaires, une fine couche de plasma et au final la membrane des hématies. Une fois lié à l'hémoglobine, l'oxygène est alors distribué vers les tissus.

Le dioxyde de carbone suit le même trajet mais dans la direction inverse.

Il est à noter que plus la surface d'échange est étendue, plus grande est la zone disponible pour la diffusion de l'oxygène. De même, plus la barrière air-sang est fine, plus la résistance à la diffusion de l'oxygène est faible et plus grande sera la quantité d'oxygène transportée par l'hémoglobine. Tout processus qui augmente l'épaisseur de l'une des couches

consécutives de la barrière de tissu air-sang peut compromettre la diffusion adéquate de l'oxygène et l'échange gazeux.

Par exemple, les substances toxiques aériennes sont capables de causer de nombreuses lésions au niveau de cette région d'échange gazeux et d'augmenter possiblement l'épaisseur du revêtement épithélial ou de modifier la perméabilité provoquant ainsi un afflux de fluides cellulaires ou acellulaires dans les espaces alvéolaires. De tels changements peuvent avoir des effets nocifs sur les échanges gazeux.

Un grand nombre d'autres processus anormaux peuvent épaissir le septum alvéolaire et affecter la diffusion de l'oxygène vers les hématies. Il s'agit souvent de la conséquence de l'accumulation anormale de constituants tissulaires dans l'espace interstitiel causée par une prolifération des cellules interstitielles. La synthèse et le dépôt accru de substances extracellulaires telles que le collagène ou l'accumulation interstitielle d'un fluide d'œdème ont des conséquences similaires (cf 3ème partie, paragraphe 2).

4.2. ROLES DE PROTECTION CONTRE LES AGENTS TOXIQUES (23)

A chaque respiration, l'organisme est potentiellement exposé à de nombreux gaz, vapeurs et particules aériennes qui peuvent endommager la fonction vitale de ce système. Quand ces agents chimiques toxiques sont inhalés et déposés sur des tissus sensibles, les fonctions respiratoires nécessaires au maintien de la viabilité morphologique ou physiologique du système respiratoire sont significativement affaiblies (cf 3ème partie, paragraphe 2.4.).

Ainsi, pour maintenir sa fonction principale d'organe d'échange gazeux, le système respiratoire mammalien doit être capable de se défendre contre l'entrée constante dans l'organisme d'agents dangereux provenant d'une exposition par inhalation. Lorsque ses défenses sont endommagées, les substances toxiques inhalées ont la capacité d'initier ou d'aggraver une pathologie existante.

La protection du système respiratoire du contact voire des effets délétères d'agents toxiques peut être réalisée par des mécanismes de défense spécifique et non spécifiques.

Les défenses non spécifiques incluent l'adsorption de vapeurs chimiques, des réponses réflexes comme des changements de ventilation ou de la toux, l'escalator muco-ciliaire ou la phagocytose par des macrophages alvéolaires.

Les mécanismes de défense spécifique sont de nature immunologique.

4.2.1. Mécanismes de défense non spécifique

4.2.1.1. Au niveau de la région nasale

La première ligne de défense est la région nasale.

Comme il l'a été étudié précédemment, les cornets nasaux permettent un mélange efficace et une humidification de l'air inspiré. Ceci crée un mécanisme de filtration de telle sorte que beaucoup de particules en suspension dans l'air inhalé n'atteindront pas les régions profondes de l'appareil respiratoire (17).

De façon similaire, l'absorption de vapeurs chimiques peut protéger les poumons contre certains agents chimiques. En effet, la cavité nasale est capable d'absorber efficacement les vapeurs en raison de son importante surface et de sa muqueuse richement vascularisée. Ces deux phénomènes peuvent en retour endommager la muqueuse nasale.

Ainsi, le nez constitue un système de filtration efficace servant à protéger le système respiratoire inférieur contre les composés chimiques toxiques et les agents biologiques. Bien que n'étant pas fondamentalement spécifique, cette barrière mécanique est très efficace. Cependant, dans certaines conditions, telles qu'une importante activité physique, les chiens recourent à une respiration de type buccale, l'air inhalé échappe ainsi à ces défenses. Il est à noter que la concentration des polluants inhalés au niveau de la région naso-pharyngée est supérieure à la concentration obtenue au niveau des conduits aérifères inférieurs et est pratiquement similaire à la concentration ambiante.

4.2.1.2. Au niveau de la région trachéo-bronchique

La région trachéo-bronchique est constituée à la fois de conduits aérifères très larges et très étroits. Par conséquent des substances de toute taille et de toute composition chimique peuvent être déposées dans cette région. Les nombreuses bifurcations de la région trachéo-bronchique sont des sites privilégiés pour les dépôts dans cette région.

Au niveau de la trachée et des bronches, l'action conjuguée du mucus et des cils vibratiles permet la remontée jusqu'à la bouche des particules superficielles tel un tapis roulant (notion d'escalator muco-ciliaire). Les particules sont ensuite éliminées du tractus respiratoire sous forme de mucosités soit par expectoration, soit par déglutition.

La couche de mucus possède également des fonctions anti-oxydantes. De plus, elle neutralise les acides et élimine les radicaux libres ce qui protège les cellules épithéliales (230).

4.2.1.3. Au niveau de la région pulmonaire

Les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense contre les petites particules inhalées qui atteignent les régions profondes de l'arbre respiratoire. Ils jouent un rôle clé dans la prise en charge et la destruction de ces agents exogènes (225). Ces cellules localisent ces agents soit par des mouvements aléatoires soit à l'aide de substances chimotactiques. Leur nombre peut considérablement augmenter en cas de dépôt accru de particules dans les poumons.

Le maintien de la stérilité pulmonaire est permis grâce à la libération d'une variété d'enzymes de digestion, de radicaux oxygénés, de cytokines et de lipides biologiquement actifs durant la phagocytose et la clairance de ces particules.

Une fois chargé de particules, les macrophages peuvent éliminer celles-ci de la région alvéolaire de différentes façons.

La première façon de quitter l'alvéole est l'escalator mucociliaire. Les macrophages atteignent la partie distale de la couche de mucus au niveau des bronchioles terminales grâce au fluide

alvéolaire. Ils sont ensuite entraînés par les battements ciliaires à l'intérieur des conduits aérifères puis sont éventuellement déglutis ou expectorés.

Les macrophages peuvent aussi migrer dans l'interstitium alvéolaire et être éliminés par le drainage lymphatique (43). Par la suite, les macrophages sont transportés par les vaisseaux lymphatiques locaux jusqu'aux nœuds lymphatiques bronchiques.

Enfin, les macrophages peuvent pénétrer directement dans le sang à partir duquel ils pourront atteindre, ainsi que les particules qu'ils contiennent, des sites extra-pulmonaires.

Si la substance ingérée est toxique pour le macrophage, il sera lysé et la particule libérée sera prise en charge par un autre macrophage dans la région alvéolaire (28). De telles substances cytotoxiques peuvent rester dans les poumons pendant un temps considérable. De même, certaines particules comme la silice persistent dans les macrophages ce qui peut conduire à la formation d'un granulome.

De la même façon que les macrophages, les granulocytes neutrophiles sont d'importantes cellules phagocytaires qui jouent un rôle majeur dans la défense du tractus respiratoire. Bien que n'étant pas des cellules présentes à l'état normal, elles peuvent facilement être recrutées à partir du lit vasculaire grâce à des facteurs chimotactiques sécrétés par les macrophages (129).

4.2.1.4. Rôle des réponses réflexes (251)

Des réponses réflexes permettent d'éliminer des agents exogènes de l'appareil respiratoire. L'innervation sensorielle est maintenue par le biais de nombreux types de chémotactiques et de mécanorécepteurs qui sont sensibles aux irritants inhalés et aux autres stress.

Dans les conduits aérifères supérieurs, ces récepteurs sont localisés dans le nez, le pharynx, le larynx et la trachée.

La stimulation des récepteurs nasaux peut causer une apnée et une bradycardie réflexe et un éternuement, tandis que la stimulation des récepteurs trachéaux causent une toux.

Ces réponses réflexes correspondent également à des changements au niveau de la ventilation, de la bronchomotricité, de la pression sanguine et de la sécrétion de mucus par les voies aérifères. Leurs fonctions sont de minimiser la pénétration de la substance aérienne dans l'appareil respiratoire, d'expulser les agents exogènes par la toux ou l'éternuement ou de provoquer des ajustements physiologiques appropriés, comme par exemple induire une bradycardie du fait de la diminution de la ventilation minute.

4.2.1.5. Métabolisation des xénobiotiques (25, 62, 239)

Il existe un métabolisme extra-hépatique qui est reconnu comme étant un facteur important d'activation ou de détoxification des composés exogènes et de métabolisme des médicaments. L'appareil respiratoire possède la capacité de métaboliser des xénobiotiques parvenus aux poumons par inhalation. Ces xénobiotiques peuvent être activés en agents qui sont immédiatement et directement toxiques pour le système respiratoire.

Les enzymes du métabolisme présentes dans le tissu respiratoire, qui sont capables de détoxifier les xénobiotiques, doivent aussi être considérées comme faisant partie des mécanismes de défense non spécifiques (125, 173)

Le métabolisme des xénobiotiques peut se produire tout le long de l'appareil respiratoire, incluant les passages nasaux, les conduits aérifères et le parenchyme pulmonaire. La distribution, les concentrations et les types spécifiques des enzymes diffèrent selon la région concernée en raison de l'hétérogénéité cellulaire de chaque partie du système respiratoire.

Des techniques de biologie cellulaire et moléculaire, utilisant l'isolement individuel de cellule puis la localisation spécifique des enzymes avec des techniques d'immunohistochimie, ont montré que les différents types cellulaires contenaient des quantités variables d'enzymes bien définies.

La localisation spécifique des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques au niveau de certains sites de l'appareil respiratoire explique en partie leur susceptibilité ou leur résistance aux lésions induites par certains agents chimiques.

L'activité enzymatique la plus importante est en général rencontrée au niveau de l'épithélium nasal, de la muqueuse olfactive ou des cellules de Clara (24).

La plupart des enzymes de métabolisation des xénobiotiques ont été identifiées dans ces régions du système respiratoire. Il s'agit par exemple du cytochrome P 450, des déshydrogénases, des estérases, des transférases, des hydrolases...

4.2.2. Mécanismes de défense spécifique(27)

Un système immunitaire fonctionnel et efficace est fondamental pour la défense des poumons.

L'appareil respiratoire possède deux compartiments immunologiques principaux qui participent aux réponses immunologiques. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT : Mucosa Associated Lymphoid Tissue) et aux bronches (BALT : Bronchus Associated Lymphoid Tissue) (22, 227). De plus, un tissu lymphatique et des lymphocytes sont présents à tous les niveaux du tractus respiratoire depuis le naso-pharynx jusqu'aux espaces alvéolaires.

Ces tissus sont importants car ils assurent une réponse immunitaire pulmonaire de type humorale ou cellulaire. En effet, ils contiennent des cellules présentatrices de l'antigène et des lymphocytes B et T nécessaires pour réagir avec l'antigène.

Les immunoglobulines de type IgA, IgG, IgM et IgE sont présentes dans les sécrétions nasales et bronchiques. Elles sont synthétisées localement et résultent de la transsudation du sérum.

Le premier compartiment immunologique est le MALT et est localisé dans le système respiratoire supérieur.

Les immunoglobulines de type A (IgA) prédominent dans cette réponse immunitaire muqueuse. Les IgA forment 50% des protéines contenues dans les sécrétions nasales; 80-90% d'entre elles sont produites localement.

Les IgE peuvent aussi être synthétisées localement et jouent un rôle clé dans les réponses d'hypersensibilité immédiate.

Le second compartiment immunologique est localisé dans l'appareil respiratoire inférieur ou région alvéolaire. Il fait intervenir une réponse immunitaire systémique typique dans laquelle les anticorps de la classe IgG prédominent. Le site principal de synthèse des lymphocytes B spécifiques d'antigènes sont les nœuds lymphatiques intrathoraciques. La présence d'antigènes dans les poumons stimule le recrutement de lymphocytes dans cette région (20). La formation de complexes immuns avec des IgG peut initier une réponse inflammatoire. Durant cette réponse inflammatoire, des lymphocytes supplémentaires sont recrutés de façon sélective au niveau des poumons à partir de la circulation. Les lymphocytes quittent ensuite les poumons par le drainage lymphatique et pénètrent dans le courant circulatoire grâce au conduit thoracique.

La réponse immunitaire de type cellulaire joue également un rôle important dans les réactions de défense pulmonaire. Elle fait intervenir des lymphocytes T, des cellules NK (Natural Killer) et des macrophages. En effet, dans le parenchyme pulmonaire, les macrophages participent à l'initiation, l'expression et la régulation de la réponse immunitaire de type cellulaire. En effet, ces cellules jouent le rôle de cellules présentatrices de l'antigène aux lymphocytes et de cellules régulatrices qui modulent la réponse immune pulmonaire en l'activant ou en la supprimant. Les mécanismes de la réponse immunitaire de type cellulaire dans les poumons sont très complexes et ne seront pas détaillées dans cette thèse.

Ainsi, le système immunitaire est très complexe et des interactions entre de multiples composés sont nécessaires à son fonctionnement adéquat. Chacune de ses étapes est une cible potentielle pour les agents chimiques toxiques.

4.3. AUTRES ROLES

4.3.1. Rôles olfactif et phonateur

Les cavités nasales possèdent un rôle olfactif. En effet, le chien est une espèce macrosmatique : la muqueuse olfactive tapisse les volutes ethmoïdales et envahit le reste de la cavités nasales voire les sinus paranasaux. De plus, elles assurent un rôle phonateur car elles jouent le rôle de caisse de résonance en amplifiant les sons émis par l'organe phonateur, le larynx.

4.3.2. Production et libération de médiateurs et d'agents pharmacologiques(224)

Les poumons sont capables de synthétiser, stocker, libérer, dégrader et inactiver une variété de médiateurs ou de substances biologiquement actives. Par exemple, l'appareil respiratoire régule les concentrations d'angiotensine, d'amines biogènes, de kinines, de peptides et de prostaglandines.

Des dommages pulmonaires sont capables de perturber certaines de ces fonctions pulmonaires.

Les médiateurs se définissent comme des composés qui sont libérés localement ou transportés dans le sang ou les fluides tissulaires. Ils peuvent participer à l'initiation, la perpétuation ou l'aggravation d'un processus pathologique.

Les amines biogènes libérées à partir des poumons, telles que les catécholamines, la sérotonine et l'histamine, jouent un rôle important dans le tonus des muscles lisses des conduits aérifères et des vaisseaux et affectent certaines fonctions cellulaires épithéliales (64).

Les catécholamines, comme par exemple l'adrénaline, la noradrénaline ou la dopamine, peuvent être libérés localement à l'intérieur des poumons ou atteindre les poumons via la circulation sanguine. Leurs effets dépendent du type de récepteur sur lesquels elles se fixent. Ainsi, elles peuvent induire une bronchodilatation (β_2), une vasoconstriction (α_2 , α_1), une vasodilatation (β_2), une sécrétion accrue des glandes sous-muqueuses (α , β_1 et β_2) et une production accrue de surfactant (β_2). La clairance de la noradrénaline fait intervenir les cellules endothéliales, ce qui n'est pas le cas de l'adrénaline et de la dopamine.

L'histamine est libérée par les mastocytes durant les réactions d'hypersensibilité immédiate. Une autre amine biogène, la sérotonine, est présente dans les plaquettes, les corps neuroépithéliaux et les mastocytes. Ces deux amines biogènes causent une broncho- ou vasoconstriction.

La clairance de la sérotonine est réalisée par le métabolisme des cellules endothéliales. Des altérations du métabolisme des amines biogènes par l'endothélium pulmonaire peuvent être utilisées comme marqueurs de lésion des cellules endothéliales.

5. PHYSIOLOGIE ET MECANIQUE RESPIRATOIRES (68, 78, 180)

Chez le chien, l'air peut entrer par les régions nasale et orale. On parle de respiration oro-nasale; le type respiratoire est costo-abdominal à prédominance costale.

La cage thoracique est une enceinte élastique, creuse, imperméable et déformable sous l'action des muscles inspiratoires et expiratoires. Il existe des mouvements thoraciques et abdominaux au cours de la respiration.

Au cours d'un effort inspiratoire, les pourcentages de la masse musculaire active chez le chien est de 44% pour le diaphragme, 32% pour les muscles intercostaux externes et de 24% pour les muscles scalènes. L'expiration est passive au repos.

Les poumons sont composés de fibres de différentes orientations : axiales, périphériques et septales. En plus des fibres élastiques, il existe des fibres résistantes composées de collagène et de réticuline. Il existe un équilibre entre les fibres élastiques et les

fibres résistantes. En cas de fibrose, les fibres élastiques deviennent minoritaires, par conséquent les poumons sont moins étirables (cf 3ème partie, paragraphe 2.2.4.).

Une ventilation adéquate nécessite une expansion et une contraction rythmiques du thorax et du diaphragme qui font entrer ou sortir l'air des poumons :

- Durant l'inspiration, l'air parvient aux poumons après passage par le tractus respiratoire supérieur et les conduits aériens; la cage thoracique se déploie et le diaphragme recule. Les poumons suivent passivement cette expansion.

- Au cours de l'expiration, le relâchement des muscles inspiratoires et du diaphragme associé à une contraction des fibres élastiques du parenchyme pulmonaire provoquent la diminution du volume interne de la cage thoracique. Les propriétés élastiques inhérentes diminuent le volume pulmonaire et l'air est ainsi expiré.

Il est à noter que chez le chien, il existe une ventilation collatérale, c'est-à-dire qu'il existe des communications entre les alvéoles, entre les bronchioles et entre les alvéoles et les bronchioles.

Des processus pathologiques qui interfèrent avec l'expansion du thorax (par exemple, les maladies neuromusculaires), des événements qui réduisent le volume que peuvent occuper les poumons à l'intérieur du thorax (par exemple, les effusions pleurales, les emphyèmes) ou des changements tissulaires qui affectent les propriétés élastiques du tissu pulmonaire (par exemple, les changements fibrotiques ou cicatriciels et une diminution de la quantité des fibres élastiques rencontrée lors d'un emphysème) affecteront de façon défavorable la ventilation.

6. CLASSIFICATION ET DEVENIR DANS L'ORGANISME DES XENOBIOTIQUES INHALES (166, 182, 253)

Dans l'organisme, le devenir, c'est-à-dire le dépôt, la rétention et la redistribution, des polluants inhalés dépend à la fois des propriétés physico-chimiques de l'agent et des caractéristiques physico-biologiques du système respiratoire (structure du système respiratoire, type de respiration (nasale, orale ou oro-nasale), fréquence, intensité et profondeur de la respiration...). Ces facteurs peuvent en retour affecter directement la toxicité de ces substances inhalées.

L'ensemble des atmosphères auxquelles l'homme ou les animaux peuvent être exposés sont divisées en premier lieu en fonction de leurs propriétés physico-chimiques bien qu'il existe évidemment des chevauchements entre les groupes. Pour les substances qui ne sont pas hautement réactives, les sites de dépôt et/ou de fixation, la fraction retenue et l'interaction avec les cellules et les tissus des conduits aérifères dépendent grandement de leur état physique. De plus, cette approche basée sur les propriétés physiques fournit au toxicologiste des informations concernant la nature du polluant à laquelle une population à risque est exposée et le type de méthodologie appropriée à la production des atmosphères tests lors des essais toxicologiques.

Ainsi, au niveau moléculaire, les polluants peuvent être :

- Des gaz (substances présentes à l'état gazeux à des température et pression normales et pouvant être liquéfiés seulement par les effets combinés d'une pression croissante et d'une température décroissante),

- Des vapeurs (fraction gazeuse d'un agent chimique qui est liquide à température ambiante et à pression atmosphérique) ou

- Des aérosols (fines particules, solides ou liquides, dans une suspension gazeuse stable; ils sont produits quand le composé est réduit à une taille particulaire lui permettant ainsi de devenir aérogène). Les aérosols peuvent exister sous forme de fumées, poussières...

Bien que la classification selon le type chimique possède de nombreuses applications, cette approche possède cependant d'importantes limites. En effet, des polluants possédant des structures chimiques différentes peuvent avoir des effets toxique similaires. Inversement, des polluants possédant des propriétés chimiques similaires ou même des agents chimiques similaires peuvent avoir des effets toxiques différents selon que la forme inhalée est un gaz ou un mélange gaz/aérosol.

Comme il l'a été vu précédemment, dans certaines conditions telles qu'une importante activité physique, les chiens recourent à une respiration de type buccale. L'air inhalé échappe alors aux systèmes de défense situés dans la région nasale. Ceci modifie significativement le schéma de dépôt des gaz ou des particules inhalés et par conséquent leur toxicité.

Le devenir dans l'organisme des toxiques inhalés peut être résumée de façon simplifiée par la figure 14.

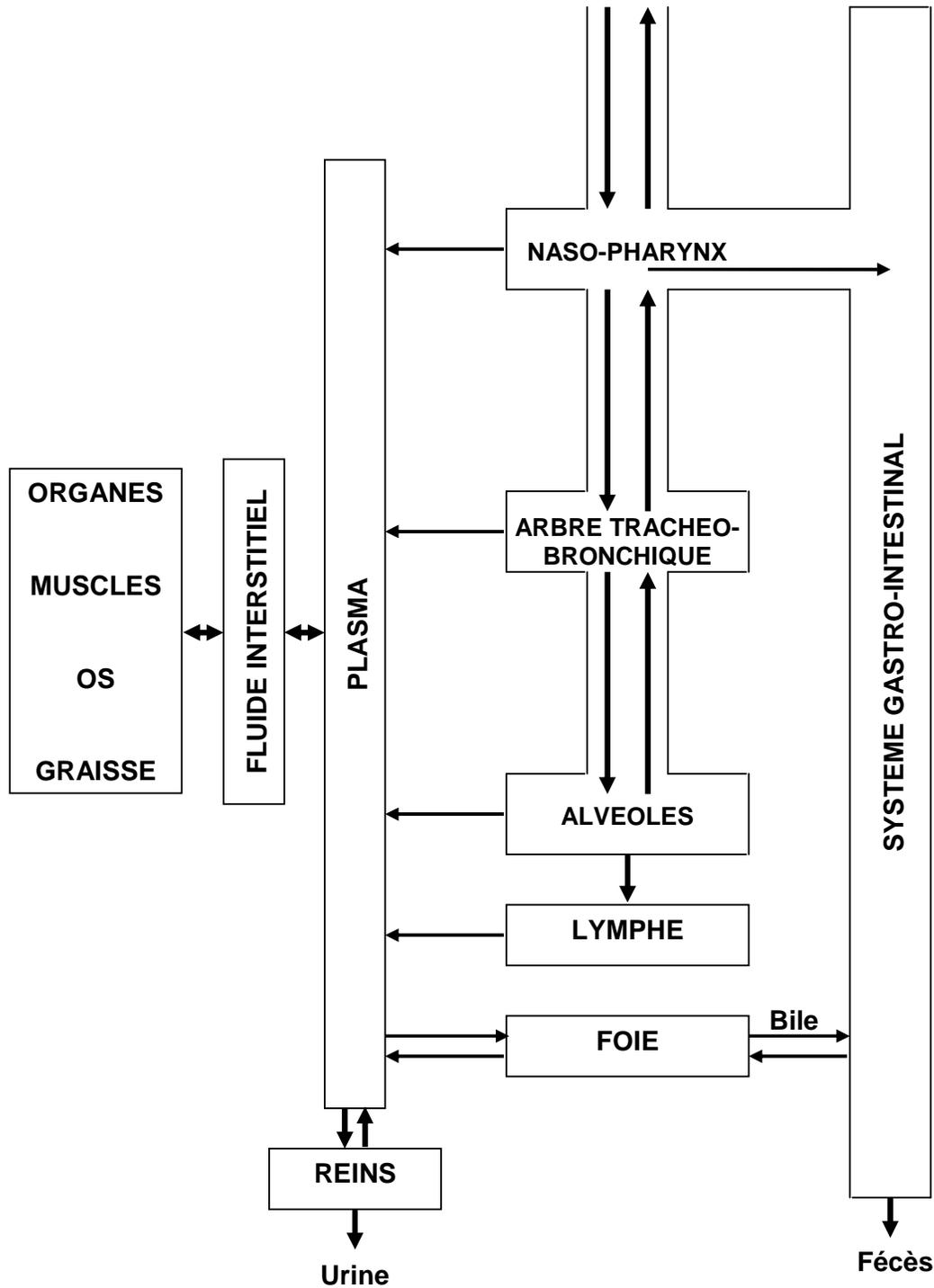


Figure 14 : Diagramme de représentation du devenir possible des agents toxiques inhalés : les possibilités de dépôt, d'absorption, de distribution et d'excrétion (212).

Lorsque l'on étudie le devenir des agents toxiques le long du système respiratoire, il est important de considérer séparément les gaz et les vapeurs d'un côté, et les particules d'un autre côté.

6.1. GAZ ET VAPEURS

6.1.1. Classification

Un grand nombre de gaz et de vapeurs, bien qu'ils exercent certains effets transitoires ou secondaires sur les poumons, ont un site principal d'action ailleurs dans l'organisme. Par exemple, les gaz et vapeurs anesthésiques provoquent comme effet majeur une dépression du système nerveux central.

Il existe deux catégories principales de gaz : les asphyxiants qui peuvent se diviser en trois sous-groupes, et les irritants pulmonaires.

6.1.1.1. Asphyxiants

Par définition, les asphyxiants sont des agents chimiques qui privent les tissus d'oxygène lorsqu'ils sont inhalés.

Les asphyxiants simples sont ceux qui, bien qu'étant biologiquement inertes ou relativement non réactifs, peuvent conduire à une asphyxie par simple déplacement de l'oxygène lorsqu'ils sont inhalés à une concentration suffisamment élevée. Les exemples d'asphyxiants simples sont l'hélium, l'hydrogène, l'azote et le méthane.

Les agents qui réduisent la capacité de transport et d'utilisation de l'oxygène constitue un second sous-groupe d'asphyxiants. On peut placer dans cette catégorie tout agent chimique qui entraîne une diminution de la fonctionnalité de l'hémoglobine. Ces agents peuvent agir indirectement en affectant la production des globules rouges dans la moelle osseuse ou directement en provoquant la production d'une hémoglobine altérée dans le sang circulant ou en empêchant la fixation de l'oxygène par l'hémoglobine. Un gaz important de cette catégorie est le monoxyde de carbone (53).

Le dernier sous-groupe est constitué par les agents qui produisent une hypoxie cellulaire. Un exemple classique est le cyanure.

6.1.1.2. Irritants

De façon générale, cette classe de composés se divisent en irritants primaires et secondaires.

Les irritants primaires sont suffisamment réactifs pour produire des effets pulmonaires tellement marqués que leurs actions systémiques sont moins importantes.

Les irritants secondaires ont une action sur les tissus de l'appareil respiratoire moins prononcée que les effets systémiques résultant de ce même toxique. Les hydrocarbures chlorés volatils sont des exemples d'irritants secondaires dans la mesure où la réaction au niveau des tissus pulmonaires est moins prononcée que leurs effets majeurs au niveau du système nerveux central et leurs effets potentiellement sévères au niveau du foie.

Les irritants provoquent une réponse inflammatoire, des changements de la perméabilité cellulaire, des pertes de fluides et de protéines dans les espaces aériens, une hyperémie et une exsudation. Lorsque la réaction est prononcée au niveau du parenchyme pulmonaire, une perte des capacités d'oxygénation peut avoir lieu. Les irritants peuvent affecter les paramètres respiratoires. Ceci sera étudié dans la deuxième partie (paragraphe 3.2.4.).

6.1.2. Devenir des gaz et vapeurs inhalés (82)

Le degré d'ionisation et la solubilité lipidique des agents chimiques sont très importants pour les expositions orales ou percutanées, tandis que l'hydrosolubilité, la réactivité tissulaire et les coefficients de partition sang-gaz sont des caractéristiques fondamentales lorsque l'on étudie le devenir dans l'organisme des gaz ou des vapeurs inhalés.

Il est fréquent de penser que les vapeurs ou les gaz, en raison de leurs propriétés physiques, pénètrent et sont absorbés uniformément dans l'ensemble de l'appareil respiratoire. Cette supposition est en général incorrecte. En effet, leurs propriétés chimiques et leur concentration ainsi que les caractéristiques du système respiratoire influencent la profondeur de pénétration des gaz ou vapeurs et la quantité qui sera absorbée.

Le site principal d'absorption des gaz et des vapeurs toxiques est la région alvéolaire mais l'absorption peut avoir lieu dans toutes les régions de l'appareil respiratoire y compris le naso-pharynx.

La diffusion simple constitue le principal mécanisme d'absorption. La plupart des gaz (monoxyde de carbone, oxydes d'azote, dioxydes de soufre) et des vapeurs de liquides volatils (benzène, tétrachlorure de carbone) traversent aisément l'épithélium alvéolaire afin de pénétrer dans le plasma. Leur absorption aisée et rapide est en relation avec l'importance de la surface alvéolaire, le débit sanguin élevé et la proximité entre le sang et l'air alvéolaire. D'un autre côté, ceci signifie également que les gaz et vapeurs sont excrétés rapidement à travers les poumons s'ils ne lient pas aux composants tissulaires.

Puisque l'absorption des gaz et des vapeurs est gouvernée par les mêmes principes, le mot gaz regroupera ces deux termes.

6.1.2.1. Influence de la solubilité

La solubilité des gaz est le principal facteur qui détermine la profondeur de pénétration, le site de dépôt et la quantité de gaz absorbée dans le système respiratoire.

Afin de comprendre la cinétique relative à la solubilité et de prédire la réponse toxique, il est nécessaire d'établir la solubilité du composé chimique non seulement dans l'eau mais aussi dans différents milieux incluant le sang, le mucus ou les tissus.

Les gaz se dissolvent le long du système respiratoire. Ceux possédant la plus grande hydrosolubilité sont en majorité éliminés par le tractus respiratoire supérieur. Les gaz moins hydrosolubles peuvent se déposer dans des régions plus profondes des poumons. Quant aux gaz insolubles, ils atteignent les alvéoles pulmonaires.

6.1.2.1.1. Cas des gaz très hydrosolubles

Les gaz les plus hydrosolubles (comme par exemple l'ammoniac, le chlorure d'hydrogène, le dioxyde de soufre...) peuvent se dissoudre dans le fluide aqueux tapissant les cellules de la région la plus proximale de l'arbre respiratoire, avant même d'avoir atteint la région alvéolaire.

Ils peuvent subir une absorption rapide par diffusion passive ou par passage à travers les pores membranaires. A de faibles concentrations, leur absorption est totale dans ces régions sans que l'atmosphère ait pu pénétrer dans la partie inférieure du système respiratoire.

Si en plus d'être hydrosolubles, les polluants sont des substances très réactives, comme le formaldéhyde, ils peuvent interagir chimiquement avec des composants cellulaires au niveau du site de dépôt et former des complexes moléculaires stables dans la région naso-pharyngée. Ainsi, la fixation nasale du formaldéhyde chez le chien est de 100%.

Par conséquent, les effets toxiques directs des gaz très solubles se limiteront à l'appareil respiratoire supérieur, en particulier les passages nasaux. L'absence de pénétration au-delà du nez limite considérablement la toxicité de la plupart des gaz très solubles. Le nez agit donc comme un épurateur pour les gaz hydrosolubles ou hautement réactifs, protégeant ainsi partiellement les poumons de potentielles lésions toxiques causées par certains gaz.

Deux remarques sont importantes à considérer. Tout d'abord, lorsque des gaz hydrosolubles sont inhalés avec des particules ou des aérosols, ils s'adsorbent à leur surface et peuvent traverser le naso-pharynx et atteindre les parties profondes des poumons entraînant ainsi des effets délétères et des réponses toxiques (cf paragraphe 6.3.). De plus, il est à noter qu'une quantité significative peut pénétrer dans l'arbre bronchique du chien lors de respiration buccale.

6.1.2.1.2. Cas des gaz possédant une solubilité intermédiaire

Les gaz relativement insolubles comme l'ozone et le dioxyde d'azote pénètrent profondément dans les poumons et atteignent les plus petites voies aériennes et les alvéoles pulmonaires.

En effet, lorsque le gaz possède une faible solubilité dans l'eau, l'humidité présente dans le système respiratoire a peu d'effet sur l'absorption au niveau de l'appareil respiratoire supérieur. Ces gaz pénétreront facilement dans la région pulmonaire et ce même à de faibles concentrations.

Une partie des gaz relativement insolubles peut tout de même être arrêtée au niveau de la région nasale. Par exemple, la fixation nasale de l'ozone est de l'ordre de 40 à 70% chez le chien.

6.1.2.1.3. Cas des gaz très insolubles

Les gaz très insolubles (comme par exemple le monoxyde de carbone et l'hydrogène sulfuré) traversent aisément et efficacement le système respiratoire. Seule une très faible partie se fixe au niveau de la région nasale du chien (1% pour le monoxyde de carbone). La majorité atteint le sang pulmonaire, permettant ainsi leur distribution dans l'ensemble de l'organisme grâce à la circulation sanguine. Par exemple, dans le cas des vapeurs liposolubles, comme les anesthésiques, les effets peuvent avoir lieu au niveau du système nerveux central.

Ainsi, les polluants liposolubles diffusent passivement à travers la fine barrière cellulaire alvéolo-vasculaire du sac alvéolaire et se dissolvent ensuite dans le sang en fonction du coefficient de partition entre l'air alvéolaire et le sang circulant. Ceci sera abordée dans le paragraphe 6.1.2.3..

6.1.2.2. Influence du métabolisme par les tissus respiratoires

La capacité enzymatique des différentes zones du système respiratoire à métaboliser les toxiques inhalés peut influencer le devenir régional des gaz (66).

La cavité nasale constitue un site cible pour les lésions induites par des métabolites (61). Par exemple, les passages nasaux sont riches en cytochromes P 450 monooxygénases grâce auxquels ils possèdent une importante capacité à métaboliser les vapeurs et les gaz inhalés (98). Si les métabolites issus de l'activité enzymatique s'avèrent être toxiques, les effets observés sur le tissu peuvent être spécifiques du site (123). Par exemple, le 3-trifluorométhylpyridine provoque des lésions de l'appareil respiratoire supérieur qui sont spécifiques de l'épithélium olfactif (111).

Une autre conséquence de la capacité de métabolisation des régions supérieures du tractus respiratoire est que non seulement les gaz inhalés peuvent être absorbés en totalité dans cette région mais aussi les composés qui pénètrent par la suite dans le torrent circulatoire peuvent être un métabolite plutôt que le composé parental.

Les régions bronchiolaires possèdent également des cellules, les cellules de Clara, qui sont capables de métaboliser les xénobiotiques inhalés avec une toxicité potentielle qui sera spécifique de la cellule, du site ou de l'espèce (117).

6.1.2.3. Influence des coefficients de partition (33)

Les gaz, dont l'absorption n'est pas influencée par le métabolisme du système respiratoire et qui pénètrent dans la région alvéolaire, seront absorbés dans le sang à travers l'interface air-sang. L'absorption des gaz dépend alors de leur solubilité dans le sang.

A l'exception de certains gaz possédant une affinité pour certains composés de l'organisme (par exemple la fixation du monoxyde de carbone à l'hémoglobine), la fixation d'un gaz par un tissu implique en général un simple processus physique de dissolution.

Le taux de fixation dépend du coefficient de partition des molécules de gaz entre deux milieux : l'air et le sang durant la phase d'absorption et le sang et les autres tissus durant la phase de distribution.

- Dans un premier temps, les molécules de gaz se dissolvent dans le sang jusqu'à ce que les molécules de gaz présentes dans le sang soient en équilibre avec celles présentes dans l'espace alvéolaire. Ainsi, à l'équilibre, le rapport de la concentration de gaz présent dans le sang par la concentration de gaz présent dans l'air alvéolaire est constant. Ce rapport de solubilité est appelé coefficient de partition sang-gaz. Ce dernier est unique et constant pour chaque gaz.

Hors, d'après la loi de Henry, la quantité de gaz dissout dans un liquide est proportionnel à la pression partielle du gaz dans la phase gazeuse à une concentration donnée avant ou à saturation. Par conséquent, plus la concentration de gaz inhalée est grande (c'est-à-dire plus la pression partielle est grande), plus importante sera la concentration du gaz dans le sang.

Ces caractéristiques concernant l'absorption peuvent être appliquées aux études de toxicité par inhalation au cours desquelles une concentration constante est maintenue dans l'atmosphère. Durant les premières phases de l'exposition, lorsque la concentration sanguine est basse, il y aura une fixation progressive jusqu'à ce que le point d'équilibre soit atteint. Une fois l'exposition terminée, l'équilibre bascule dans le sens contraire et la gaz absorbé diffusera dans l'air alvéolaire et sera expiré.

Dans la pratique, pour une substance possédant un très faible rapport de solubilité comme l'éthylène (= 0.14), seul un faible pourcentage du gaz total présent dans les poumons est pris en charge par le sang durant chaque circulation. En effet, le sang est rapidement saturé par le gaz et la majeure partie sera expirée.

Par conséquent, une augmentation de la fréquence respiratoire ou du volume minute ne change pas le transfert d'un tel gaz dans le sang.

Par contre, lors d'une augmentation du débit sanguin, une plus grande quantité de gaz ou de vapeur inhalée est absorbée dans le sang. Ceci implique une perfusion sanguine accrue au niveau pulmonaire qui augmente le remplacement du sang saturé circulant dans les capillaires pulmonaires. Ce phénomène se produit lors d'un exercice nécessitant une importante activité musculaire.

La majorité d'un gaz possédant un important rapport de solubilité, tel que le chloroforme (= 15), est transférée au sang durant chaque cycle respiratoire de sorte que seul une petite partie reste dans les alvéoles jusqu'à la prochaine inhalation.

L'équilibre entre le sang et l'air est atteint plus lentement pour ces composés très solubles dans le sang (comme le chloroforme), que pour les composés moins solubles comme l'éthylène. En effet, plus le composé est soluble dans le sang, plus la quantité dissoute dans le sang est grande : l'air alvéolaire transportant une quantité limitée de produit, un plus grand nombre d'inspirations est alors nécessaire et donc l'équilibre est atteint plus lentement. Cet équilibre sera encore plus long à atteindre si le produit est aussi liposoluble.

Concernant les gaz hautement solubles, le principal facteur limitant le taux d'absorption est la respiration. Puisque le sang élimine des poumons la totalité des gaz avec un fort rapport de solubilité, une augmentation du débit sanguin n'augmente pas le taux d'absorption. Par contre, ce taux peut être grandement augmenté par une fréquence respiratoire ou un volume minute accrus, comme ce qui se produit lors d'un exercice physique vigoureux et épuisant.

- Dans un deuxième temps, les molécules de gaz absorbées pénètrent dans la circulation systémique sans subir de métabolisme hépatique. Le sang transporte ces molécules de gaz dissoutes au reste de l'organisme.

Dans chaque tissu, les molécules de gaz sont transférées du sang au tissu jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint, à une concentration tissulaire dictée par le coefficient de partition tissu-sang.

Après avoir libéré une partie du gaz au niveau des tissus, le sang retourne au niveau des poumons pour prendre en charge d'autres molécules de gaz. Ce processus continue jusqu'à ce que le gaz atteigne un équilibre entre le sang et chaque tissu en fonction des caractéristiques des coefficients de partition tissu-sang de chaque tissu. A ce moment, aucune absorption supplémentaire de gaz ne peut avoir lieu tant que la concentration d'exposition demeure constante car un état stable a été atteint. Bien sûr, si une biotransformation ou une excrétion se produisent, l'absorption alvéolaire continuera jusqu'à ce qu'un état stable correspondant soit établi.

6.2. PARTICULES ET AEROSOLS (244)

En général, les efficacités relatives de dépôt des particules dans les systèmes respiratoires de l'homme et des animaux sont identiques. Lorsque les différences au niveau des poumons, de la taille corporelle et de la ventilation sont considérées, les animaux de petite taille qui inhalent la même concentration atmosphérique reçoivent une plus grande dose par unité pulmonaire ou par unité de poids corporel.

Il est considéré que, pour des particules de diamètre approximatif de 1 μm , un chien reçoit une dose 3 fois supérieure à celle d'un homme pour une unité de masse pulmonaire.

Le dépôt des particules à l'intérieur du système respiratoire est gouverné par trois facteurs principaux (166) :

- L'anatomie du système respiratoire
- Le modèle respiratoire et le mode de flux de l'air
- Les caractéristiques physico-chimiques des particules.

6.2.1. Influence de l'anatomie du système respiratoire sur le dépôt des particules

L'anatomie des régions oro-nasale et pharyngée, les dimensions et la géométrie des conduits aérifères, la taille et la forme des ouvertures dans ce système et la distribution du mucus définissent les caractéristiques du système respiratoire qui déterminent la profondeur de pénétration et le dépôt des particules inhalées.

Chez le chien, la surface alvéolaire disponible pour les échanges gazeux est de l'ordre de 90 m^2 . L'air pénètre dans le système respiratoire à travers un conduit initial mais atteint au final une surface de 90 m^2 de tissu d'échange gazeux. Par conséquent, le conduit initial, la trachée, qui possède une aire de coupe transversale de l'ordre du cm^2 , doit se diviser de façon répétée.

Comme nous l'avons vu dans l'anatomie de la région bronchique (paragraphe 2.2.), le type d'embranchement possède deux caractéristiques qui influencent le type d'écoulement de l'air et dont résulte le dépôt des particules. Ceci est schématisé par la figure 15.

- Tout d'abord, le diamètre des conduits aérifères devient progressivement de plus en plus petit à chaque division.

- Dans un deuxième temps, comme le nombre total de conduits aérifères augmente à chaque division, l'aire de coupe transversale augmente au fur et à mesure que l'on pénètre dans les poumons.

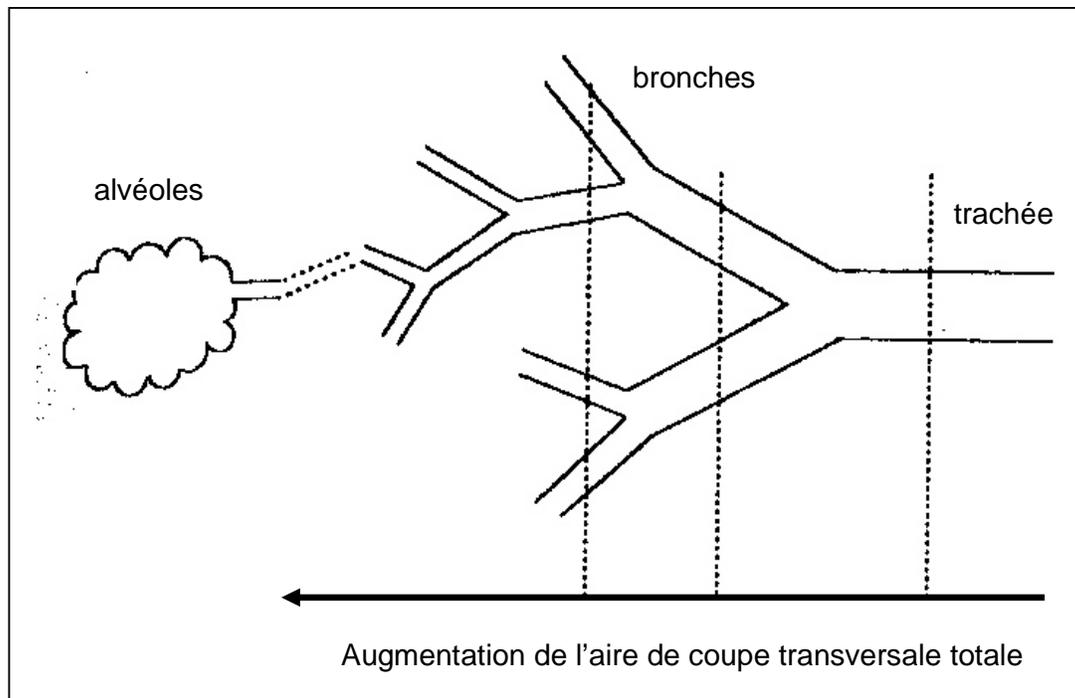


Figure 15 : Diagramme de représentation des bifurcations du système respiratoire pour illustrer l'augmentation de l'aire de coupe transversale des conduits aérifères (112).

6.2.2. Influence du modèle respiratoire sur le dépôt des particules

Un facteur important dans le dépôt des particules est le modèle respiratoire. Les caractéristiques du modèle respiratoire qui affectent le dépôt incluent la fréquence respiratoire, la vitesse de l'air, les volumes courant et résiduel, la distribution à l'intérieur des conduits aérifères...

La fréquence et la profondeur respiratoires d'un chien dépendent de son âge, de son activité physique, de la température et de l'humidité locales. Elles jouent un rôle important dans la détermination de la quantité de particules retenue dans les poumons. Le dépôt augmentera avec la durée et la profondeur de la respiration. Il est à noter que le dépôt se produit à la fois pendant l'inspiration et l'expiration.

Au repos, durant la respiration, une grande partie des particules inhalées seront expirées. Pendant un exercice, lorsqu'un volume important d'air est inhalé à grande vitesse, c'est-à-dire lorsque le débit de l'air augmente, le dépôt des particules augmente. Il en est de même lors d'un arrêt transitoire de la respiration.

Les facteurs qui modifient le diamètre des conduits aérifères peuvent altérer le dépôt des particules. Par exemple, lors de bronchite chronique, l'épaisseur du mucus est plus importante et peut bloquer partiellement les conduits aérifères dans certaines zones. Les particules présentes dans l'air qui passent à travers ces conduits aérifères partiellement obstrués ont plus tendance à se déposer.

De plus, les substances irritantes comme la fumée de cigarette augmentent le dépôt trachéo-bronchique des particules car ils provoquent une bronchoconstriction.

6.2.3. Influence du mode de flux de l'air sur le dépôt des particules

Un volume donné d'air se déplace de plus en plus lentement au fur et à mesure qu'il progresse dans la profondeur de l'appareil respiratoire.

L'air pénétrant dans le système respiratoire possède une vitesse donnée. Celle-ci est liée au volume et à la surface de coupe transversale du conduit aérifère. Toutes les particules en suspension dans l'air inhalé auront la même vitesse.

A la première bifurcation, la vitesse diminuera puisque le même volume d'air passe à travers une plus grande surface. Des diminutions successives de la vitesse se produisent à chaque embranchement jusqu'à obtenir une vitesse pratiquement nulle au niveau des régions respiratoires les plus profondes.

En parallèle avec les changements de vitesse, l'air inhalé subit des changements de direction en raison tout d'abord de la structure du système respiratoire supérieure (régions nasale et pharyngée) puis des bifurcations multiples des conduits aérifères. Dans la partie supérieure non ramifiée et dans les premières parties ramifiées de l'arbre respiratoire, les changements de direction sont relativement brutaux tandis qu'ils sont légers en descendant le long des voies aérifères.

En combinant ces deux facteurs, l'air inhalé subit une diminution continue de sa vitesse ainsi qu'un grand nombre de changements directionnels depuis le nez ou la bouche

jusqu'aux zones profondes pulmonaires. Toute particule en suspension dans l'air inhalé sera sujette à ces mêmes modifications.

En bilan, la prise en compte de la structure du système respiratoire et du mode de flux de l'air permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

- Les grosses particules inhalées présentes dans l'air peuvent rester en suspension à grande vitesse mais commencent à se déposer dès que la vitesse ralentit. De plus, ces grosses particules qui possèdent une importante vitesse initiale ont tendance à se déposer au niveau d'un site de changement de direction des voies aérifères plutôt que de suivre le changement directionnel du flux d'air.
- Les plus petites particules suivront le changement de direction du flux d'air et resteront en suspension, notamment si la ramification est moins brutale. Cependant, lorsque la vitesse diminue, elles seront plus influencées par la gravité et commenceront à se déposer.
- Concernant les particules de très petite taille qui, par conséquent, ont des vitesses de sédimentation très lentes, elles se comportent comme des molécules de gaz et suivent la diffusion de Brownian (cf paragraphe 6.2.5.5.).

6.2.4. Les caractéristiques des particules qui influencent leur dépôt

6.2.4.1. Solubilité et hygroscopie

Une des caractéristiques importantes qui influence l'absorption après une exposition à des aérosols est l'hydrosolubilité de l'agent chimique présent dans l'aérosol.

Si la particule est hygroscopique, sa taille peut augmenter considérablement lors de sa pénétration dans le système respiratoire et la particule se déposera en fonction de sa taille hydratée. Ce phénomène augmente la chance de dépôt d'un aérosol sec.

Par exemple, les substances hygroscopiques comme le chlorure de sodium, l'acide sulfurique et le glycérol se chargent en eau et augmentent de taille dans l'atmosphère chaude et saturée de l'appareil respiratoire.

Il est également nécessaire d'établir la solubilité des particules dans différents milieux comme le sang, le mucus ou les tissus. En effet, certaines particules comme les aérosols thérapeutiques sont des gouttelettes aqueuses qui se mêlent rapidement au mucus, augmentant de façon importante leur biodisponibilité pour l'absorption.

6.2.4.2. Charge électrostatique

La présence d'une charge électrostatique sur une particule inhalée influence son taux de dépôt. En effet, lorsque les particules présentent une charge électrostatique, le dépôt au niveau des conduits aérifères est augmenté de 15 à 30%. La grande majorité du dépôt semble alors se produire au niveau de l'arbre trachéo-bronchique.

Ce phénomène ne semble pas être influencé par la concentration et la taille des particules, ou par la présence simultanée de charges négative et positive dans un même aérosol.

6.2.4.3. Forme

La manière dont la forme des particules affectent leur comportement dans le flux respiratoire est complexe. La plupart des particules ne sont pas sphériques. Elles peuvent avoir une forme géométrique comme une forme cubique ou cylindrique ou une forme irrégulière. La forme aura une grande influence notamment dans le cas des fibres (238).

La forme des particules influencent leur force de traînée et leur vitesse de sédimentation. Lorsqu'une particule ne possède pas une forme sphérique, le taux de sédimentation est augmentée. Une surface rugueuse et une grande densité des particules augmentent également le phénomène de dépôt.

De façon à décrire le mouvement d'une particule de façon mathématique, une particule de forme irrégulière ou non sphérique est fréquemment assimilée à une sphère équivalente possédant les même masse, volume et résistance aérodynamique. Le diamètre aérodynamique est le diamètre d'une sphère de densité unitaire (1 g.cm^{-3}) qui possède la même vitesse de sédimentation qu'une particule. Le diamètre aérodynamique prend en compte à la fois la densité de la particule et sa résistance aérodynamique et correspond à la propriété clé des particules qui caractérise le dépôt respiratoire (cf paragraphe suivant).

6.2.4.4. Taille ou diamètre

La vitesse du flux d'air et le lieu de dépôt sont intimement liés à la taille des particules. Cette dernière est le facteur décisif qui détermine la profondeur de pénétration dans l'arbre respiratoire et le degré de rétention de la particule inhalée. Rétention ne signifie pas nécessairement absorption : par exemple dans le cas de la silicose ou de l'antracose, la substance retenue reste localement. La rétention peut être causée par la précipitation de particules inhalées à différents niveaux du système respiratoire (104, 163, 169).

Il existe deux types d'aérosols :

- Les aérosols monodispersés où les particules sont toutes de la même taille et
- Les aérosols polydispersés où les particules ont une taille hétérogène.

Les aérosols sont le plus fréquemment de type polydispersé. Dans ce dernier cas, les petites particules ont tendance à s'agréger aux plus grosses particules, ce phénomène est nommé effets de Weigner.

Par conséquent, lors d'exposition à des aérosols polydispersés, particulièrement lorsque le flux de l'air est turbulent, la plupart des particules seront éliminées dans les conduits aérifères supérieurs en raison de l'agrégation particulaire qui facilite les phénomènes de filtration et d'impaction. L'effet de Weigner n'a pas lieu lorsque le flux d'air est laminaire et donc ne se produit pas dans la partie distale des poumons.

Quand une atmosphère est inhalée, les particules peuvent se déposer dans n'importe quelle région du système respiratoire, leur site final de dépôt étant guidé en majorité par le diamètre des particules.

Le diamètre physique d'une particule n'est pas en général une mesure convenable pour décrire son comportement dans le flux d'air respiratoire. Le diamètre aérodynamique d'une particule fournit la meilleure mesure disponible permettant d'examiner le dépôt régional dans le système respiratoire. Il est déterminé en utilisant une instrumentation spécialisée.

Comme nous l'avons dit dans le paragraphe précédent, le diamètre aérodynamique représente le diamètre d'une sphère de densité unitaire possédant la même vitesse de sédimentation terminale qu'une particule indépendamment de sa taille, sa forme et sa densité.

La relation entre le diamètre aérodynamique et le diamètre physique est gouverné par la relation suivante :

$$\text{Diamètre aérodynamique} = \text{Diamètre physique} \times (\text{Densité})^{1/2}$$

Par conséquent, une particule de 1 μm de diamètre physique et possédant une densité de 4 g/cm^3 aura le même comportement aérodynamique dans l'air qu'une particule de densité unitaire et possédant un diamètre de 2 μm . En fonction de la taille de la particule, notamment pour celles possédant un diamètre inférieur à 1 μm , des facteurs de correction supplémentaires peuvent s'ajouter à l'équation ci-dessus. Des données supplémentaires sont décrites par Hidy (113), Hinds (114) et Vincent (242).

6.2.5. Les mécanismes de dépôt

Il existe cinq mécanismes fondamentaux grâce auxquels les particules inhalées se déposent dans le tractus respiratoire : l'interception, l'impaction inertielle, la sédimentation gravitationnelle, la diffusion de Brownian et la précipitation électrostatique. Ces mécanismes sont représentés sur la figure 16.

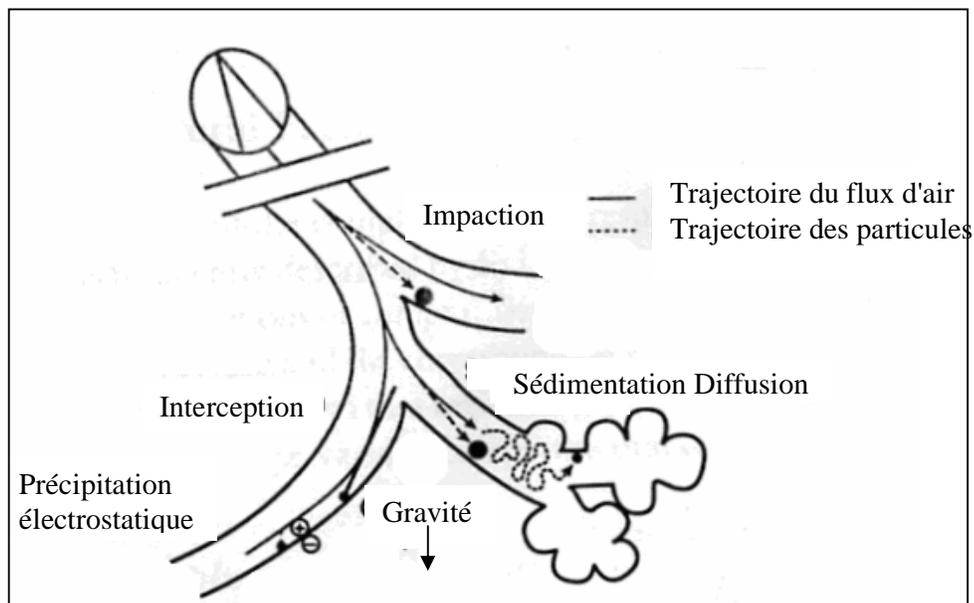


Figure 16 : Mécanismes de dépôt des particules dans le système respiratoire (217).

6.2.5.1. L'interception

L'interception se produit uniquement lorsque la trajectoire de la particule est tellement proche des conduits aérifères qu'une partie de la particule entre en contact avec leur surface. L'interception est un mode important de dépôt pour les fibres. En effet, ce sont de très longues particules; il est donc inévitable qu'elles viennent au contact ou qu'elles soient interceptées par la paroi des voies aérifères lors d'un changement de direction du flux d'air.

Ce mécanisme est représenté sur la figure 17 ci-dessous.

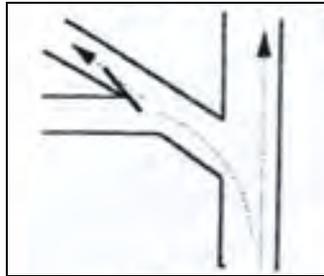


Figure 17 : Représentation schématique du phénomène d'interception des particules.

6.2.5.2. L'impaction inertielle

L'impaction ne se produit seulement lorsqu'il y a combinaison de la vitesse et du changement directionnel du flux d'air. Elle a lieu de façon générale au niveau du tractus respiratoire supérieur et dans les premières parties du système trachéo-bronchique sous certaines conditions, comme par exemple l'halètement chez le chien.

Lorsque la vitesse du flux est importante, l'air inhalé et les particules qu'il transporte subissent une impaction inertielle au niveau du nez ou des bifurcations des larges conduits aérifères. Chaque embranchement des conduits aérifères constitue donc un site d'impaction des particules et les diamètres de plus en plus étroits favorisent leur collecte sur les parois des voies aérifères. En raison de leur inertie et de leur vitesse acquise, les particules en suspension dans l'air ont tendance à continuer à se déplacer en suivant leur trajectoire initiale pendant une certaine distance, puis elles répondent au changement de direction. Si la bifurcation est relativement symétrique, les particules qui se déplacent au centre du conduit ont plus tendance à se déposer.

De même, quand la vitesse est élevée, l'écoulement de l'air est en général turbulent, ainsi l'impaction des particules sur les parois muqueuses est plus fréquente. Comme nous l'avons expliqué dans la l'anatomie de la région nasale, la surface de la zone muqueuse est augmentée par les circonvolutions des cornets nasaux. Ceci entraîne des turbulences qui, par conséquent, augmentent l'impaction des particules. Puis, en descendant le long de l'arbre respiratoire, la vitesse du flux d'air diminue et l'impaction inertielle devient un phénomène rare.

L'impaction constitue le principal mécanisme par lequel les particules de diamètre supérieur ou égal à $0.5 \mu\text{m}$ sont déposées dans la partie supérieure de l'appareil respiratoire. La probabilité d'impaction augmente avec la vitesse de l'air, la fréquence respiratoire, la taille physique et la densité de la particule.

La figure 18 représente le phénomène d'impaction inertielle.

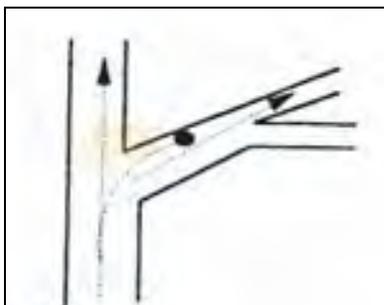


Figure 18 : Représentation schématique du phénomène d'impaction inertielle des particules.

6.2.5.3. La sédimentation gravitationnelle

Toutes les particules en suspension dans l'air sédimentent lentement sous l'influence de la gravité. Quand cette force dépasse les autres forces auxquelles une particule est soumise, telles que la vitesse, la résistance de l'air et la flottabilité, la particule se dépose sur les parois du tractus respiratoire.

La flottabilité et la résistance de l'air entraînent la particule vers le haut, tandis que la force gravitationnelle pousse la particule vers le bas. Finalement, la force gravitationnelle s'équilibre avec la somme de la flottabilité et de la résistance de l'air et la particule continue à sédimenter avec une vitesse constante nommée vitesse de sédimentation terminale. La vitesse à laquelle une particule se dépose est proportionnelle à sa densité et à son diamètre.

Ce phénomène prédomine dans les régions basses de l'appareil respiratoire. En effet, la sédimentation provoque le dépôt dans les petites bronches, les bronchioles et les espaces alvéolaires, où les conduits aérifères sont petits et la vitesse du flux d'air est faible. De plus, à cette faible vitesse, l'écoulement de l'air est de type laminaire, ce qui facilite ainsi l'apparition d'un phénomène de sédimentation par gravité.

La sédimentation est un mécanisme important pour les particules de diamètre aérodynamique supérieur ou égal à $0.5 \mu\text{m}$ lorsque la vitesse de l'air est relativement faible. Les facteurs influençant le dépôt par ce mécanisme sont ceux mentionnés au-dessus dans le cas de l'impaction en ajoutant le temps de résidence dans le système respiratoire.

La figure 19 représente de façon simplifiée le phénomène de sédimentation des particules.

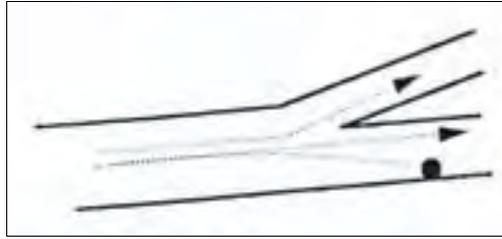


Figure 19 : Représentation schématique du phénomène de sédimentation gravitationnelle des particules.

6.2.5.4. La diffusion de Brownian

Les particules très fines, c'est-à-dire plus petites qu'environ $0.5 \mu\text{m}$, sont sujettes à l'impact et au bombardement par des molécules de gaz environnantes et donc acquièrent un mouvement aléatoire dans l'air, nommé mouvement de Brownian. Cette propriété est inversement proportionnelle au diamètre des particules, c'est-à-dire que le mouvement de Brownian augmente en même temps que la taille des particules diminue, mais est indépendant de leur densité.

A l'intérieur du système respiratoire, un tel mouvement des particules entraîne le contact de celles-ci avec les parois des voies aérifères les plus proches au niveau desquelles elles se déposent comme nous le montre la figure 20.

Le dépôt par ce mécanisme est favorisée lorsque la vitesse de l'air est lente voire absente et donc prédomine dans les régions bronchiolaire et alvéolaire.

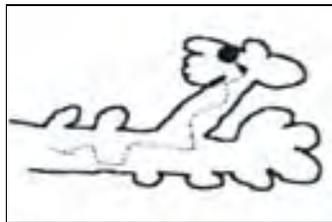


Figure 20 : Représentation schématique du phénomène de diffusion de Brownian des particules.

6.2.5.5. La précipitation électrostatique

Les aérosols générés dans les études par inhalation portent fréquemment une importante charge électrostatique en raison des méthodes utilisées pour leur production. De telles charges peuvent accroître la fraction de l'aérosol inhalé qui se dépose grâce à une interaction de charge entre les particules ou entre les particules et le système respiratoire.

6.2.6. Bilan : lieu et mode de dépôt des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique (105, 144, 215, 243)

De façon générale, chez le chien, 25% des particules inhalées sont exhalées, 50% sont déposées dans les zones supérieures et 25% sont déposées dans les zones profondes de l'appareil respiratoire.

Lorsque la taille de la particule est comprise entre 10 et 30 μm , la vitesse de sédimentation causée par la gravité est tellement élevée que la probabilité d'entrée des particules de cette taille dans les passages nasaux est faible malgré la grande vitesse inspiratoire rencontrée dans cette région. Si ces grosses particules sont inhalées et atteignent malgré tout les voies respiratoires, elles se déposent dans la région naso-pharyngée et ne peuvent pas pénétrer au-delà du larynx .

C'est dans la région naso-pharyngée que l'air possède sa plus grande vitesse et que la turbulence est la plus importante. Lors des changements rapides de direction au niveau des cornets nasaux et du pharynx, le dépôt des particules dont le diamètre aérodynamique est compris entre 5 et 10 μm est favorisé et le processus dominant est l'impaction inertielle.

Ainsi, la fonction de la région naso-pharyngée est d'éliminer les particules inhalées de grande taille (supérieure à 5 μm). L'importance de cette région est souvent négligée mais cet oubli est inapproprié car cette région reçoit la plus grande concentration en agents chimiques.

Ensuite, en descendant le long du système respiratoire, une diminution de la vitesse de l'air associée à des changements de direction moins abrupts favorise un plus grand temps de résidence des particules qui pénètrent la région trachéo-bronchique.

Les particules de diamètre compris entre 1 et 5 μm qui n'ont pas été arrêtées par la région naso-pharyngée se déposent le long d'arbre trachéo-bronchique par impaction inertielle au niveau des bifurcations des conduits aérifères ou par sédimentation gravitationnelle à la surface des voies aérifères. La gravité correspond au mode de dépôt majoritaire dans cette région.

Dans les alvéoles, malgré le fait que la vitesse de l'air approche de zéro et que les changements de direction sont peu importants, la gravité est moins importante car seules les plus petites particules, de diamètre inférieur à 1 μm , atteignent la région alvéolaire.

A ce niveau, ces petites particules touchent les parois alvéolaires en raison du mouvement aléatoire de Brownian dans les sacs aériens grâce au phénomène de diffusion (41).

Cependant, il ne faut pas oublier que des particules possédant des formes ou des configurations particulières peuvent, en raison de leurs propriétés aérodynamiques, atteindre également la région alvéolaire, où elles se déposent à la jonction bronchiolo-alvéolaire. Tel est le cas des fibres d'amiante qui peuvent atteindre 50 μm de long pour un diamètre compris entre 0,4 et 1 μm .

La figure 21 ci-dessous nous montre les courbes correspondant aux pourcentages de dépôt régional pour différentes tailles particulières obtenues chez l'homme. Des courbes pratiquement similaires sont obtenues chez le chien.

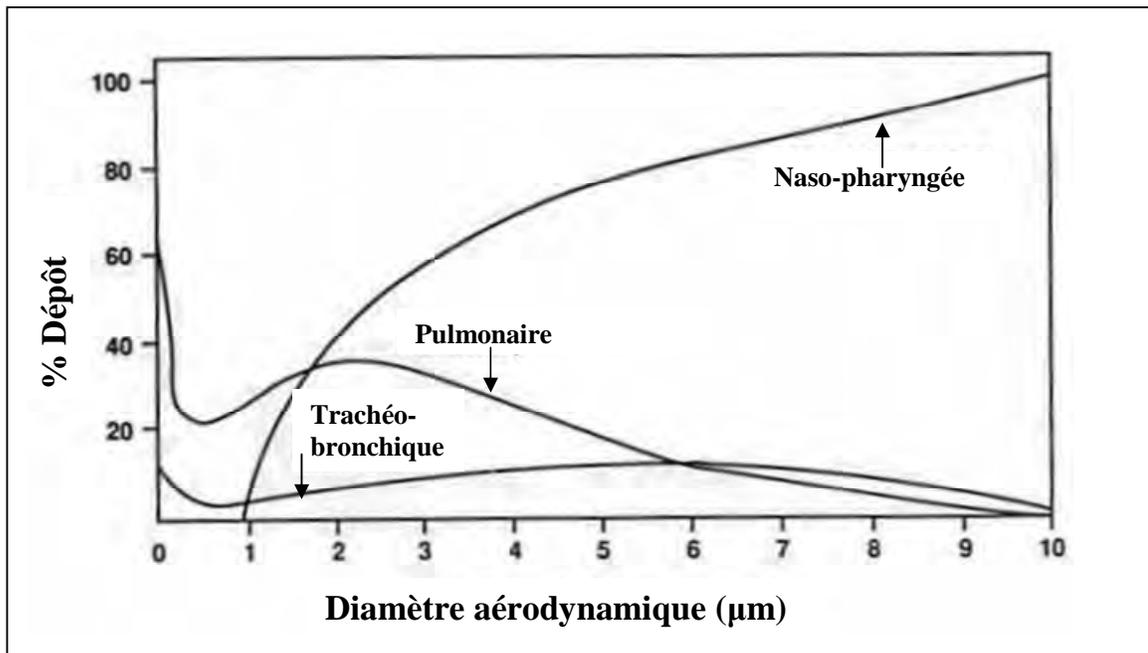


Figure 21 : Dépôt régional des aérosols inhalés en fonction de la taille particulaire chez l'homme (107).

En conclusion sur cette partie, la figure 22 ci-dessous représente de façon schématique le devenir des particules inhalées. Elle nous montre les lieux et les modes de dépôt dans le système respiratoire.

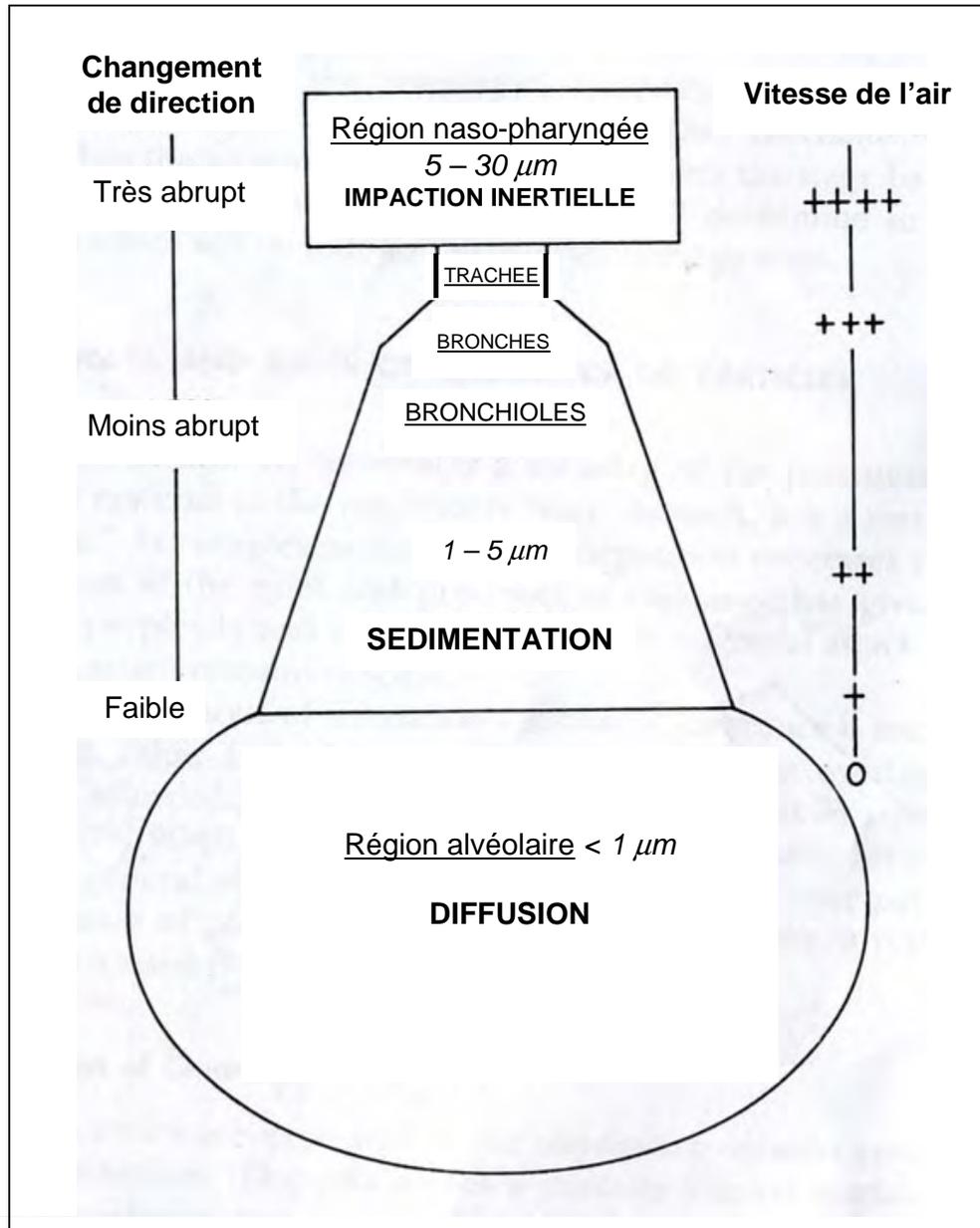


Figure 22 : Paramètres influençant le dépôt des particules dans le système respiratoire (43).

6.2.7. Mesure du dépôt des particules dans le système respiratoire (106)

Le dépôt des particules dans le système respiratoire n'est pas toujours aisé à évaluer mais les approches suivantes peuvent être d'une grande aide.

6.2.7.1. Microscopique

Les particules peuvent être opaques et/ou colorées à la lumière, par conséquent visibles en microscopie optique, comme par exemple le carbone. Certains composants peuvent être cristallins et être visibles grâce à des lentilles polarisées, comme par exemple la silice.

6.2.7.2. Histochimique

De nombreux agents peuvent réagir avec des agents chimiques afin de donner un produit final coloré, par exemple l'oxyde de fer par la réaction au bleu de Prusse.

6.2.7.3. Radioisotopique

La plupart des composés peuvent être obtenus avec un label radioactif, permettant l'émission d'une faible énergie β . Deux procédures peuvent être utilisées :

- Comptage de scintillation liquide :

Dans cette méthode, des morceaux de poumons ou de conduits aérifères sont rendus solubles par digestion caustique et les émissions ioniques sont mesurées dans un compteur de scintillation liquide. Cette méthode peut être utilisée avec des marqueurs de radiation émettant des particules γ .

- Autoradiographie :

Bien qu'elle soit techniquement plus difficile, cette méthode permet une localisation plus précise des particules. De plus, une quantification peut être obtenue par des méthodes morphométriques.

En principe, l'émulsion photographique de haute sensibilité est placée sous la section de tissu respiratoire. Les sections sont maintenues dans l'obscurité totale pendant plusieurs jours ou semaines puis développées avec des techniques photographiques standards. Des grains noirs argentés identifient le site de dépôt.

6.2.8. Mécanismes de clairance des particules(216, 217)

Un aspect important de la défense pulmonaire est l'élimination des particules déposées. Cette dernière dépend des caractéristiques physico-chimiques de la particule et des mécanismes de clairance biologique de l'appareil respiratoire. Une élimination rapide amoindrit le temps disponible pour endommager les tissus pulmonaires ou permettre une absorption locale.

La clairance des particules, c'est-à-dire les mécanismes spécifiques permettant l'élimination des particules de l'appareil respiratoire, varie selon leur site de dépôt dans le système respiratoire et dure de quelques heures à quelques années.

En fonction du mécanisme de clairance mis en jeu, la clairance des particules peut finalement avoir lieu par le biais de la toux, du jetage, de l'éternuement, du système gastro-intestinal (ce qui peut potentiellement conduire à une source additionnelle d'exposition), de la vascularisation pulmonaire, des nœuds et des vaisseaux lymphatiques à partir desquels elles peuvent être dissoutes puis pénétrer dans la circulation veineuse.

6.2.8.1. Clairance naso-pharyngée

Les particules déposées dans la région naso-pharyngée sont éliminées par des mécanismes variés dépendant de leur site de dépôt et de leur solubilité dans le mucus.

Comme nous l'avons abordé en histologie, la partie antérieure du nez est recouverte d'un épithélium squameux relativement sec. Les particules déposées dans cette zone tendent à rester au niveau de ce site de dépôt jusqu'à ce qu'elles soient éliminées par éternuement ou jetage.

Les autres parties de la région naso-pharyngée sont recouvertes en majorité par un épithélium muco-ciliaire. Cette barrière de mucus recouvrant l'épithélium nasopharyngée joue un rôle important dans la clairance des composés déposés en fournissant une surface collante et humide qui piège les particules inhalées.

Les particules sont ensuite transportées vers la bouche, par le biais du battement des cils sous-jacents, où elles sont dégluties ou expectorées.

Les particules insolubles sont en général éliminées de cette région et avalées une heure après leur dépôt chez un chien sain.

En ce qui concerne les particules solubles dans le mucus, elles peuvent se dissoudre et pénétrer dans l'épithélium et/ou dans le sang avant même d'avoir pu être éliminées mécaniquement.

Cependant, après certaines expositions, quelques particules peuvent finalement rester dans la zone naso-pharyngée pendant plusieurs jours après leur dépôt. Une telle rétention des particules peut causer de graves dommages.

Des incertitudes persistent à propos de la clairance des particules déposées sur les régions olfactives ou dans des zones endommagées par une infection, une maladie chronique ou une lésion toxique.

6.2.8.2. Clairance trachéo-bronchique

Les particules déposées dans la région trachéo-bronchique sont éliminées en majorité par l'escalator muco-ciliaire qui constitue un élément essentiel du système de défense pulmonaire. En effet, la surface des cellules tapissant l'arbre trachéo-bronchique est recouverte par une couche de mucus. Cet environnement aqueux favorise une dissolution partielle et éventuellement une absorption des particules hydrosolubles, notamment celles présentes sous forme de gouttelettes liquides.

La phagocytose par les macrophages se produit également à ce niveau mais elle revêt une plus grande importance dans la région alvéolaire.

Le système muco-ciliaire transporte continuellement les particules déposées et les macrophages chargés en particules vers l'entrée de l'appareil respiratoire grâce au déplacement de la couche de mucus par le battement des cils sous-jacents. La toux et l'éternuement augmentent de façon importante le mouvement du mucus. Au niveau de l'oropharynx, le mucus contenant les particules et les macrophages est soit expectoré, soit dégluti et passe dans l'appareil gastro-intestinal (3).

La clairance muco-ciliaire est relativement rapide chez les organismes sains. Le taux de clairance est plus rapide dans les grands conduits aérifères que dans les petits (166). Autrement dit, la clairance des particules de petite taille déposées plus profondément dans les conduits aérifères est donc plus lente que celle concernant les particules de grande taille déposées plus proximale dans les conduits aérifères.

La clairance est complète en 24 à 48 heures pour les particules déposées dans les conduits aérifères inférieurs.

6.2.8.3. Clairance alvéolaire(43, 79, 136, 168, 170)

Les particules déposées au niveau des alvéoles, qui ne contiennent pas d'escalator muco-ciliaire, font appel à d'autres processus de clairance. Il existe trois mécanismes fondamentaux par lesquels des matériaux déposés sont éliminés de l'appareil respiratoire profond :

- Tout d'abord, les particules peuvent être éliminées des alvéoles par des processus physiques. Les particules déposées sur la couche de fluide de l'alvéole peuvent être aspirées par l'escalator muco-ciliaire de la région trachéo-bronchique. A partir de là, elles sont transportées jusqu'à la bouche et peuvent être dégluties. L'origine de cette fine couche de fluide dans l'alvéole est probablement un transsudat de lymphe et des sécrétions de lipides et d'autres composés par l'épithélium alvéolaire. Le fluide alvéolaire circule par un mécanisme inconnu jusqu'aux bronchioles terminales. Ce flux semble dépendre du flux lymphatique, de l'action des capillaires, des mouvements respiratoires des parois alvéolaires, de la nature cohésive de la couche de fluide du système respiratoire et du pouvoir propulsant des bronchioles ciliées.

- Secondairement, les particules peuvent être phagocytées au niveau des alvéoles. Il s'agit du mécanisme majeur de clairance au niveau du parenchyme pulmonaire. Les principales cellules responsables de la phagocytose des débris alvéolaires sont des phagocytes mononuclés : les macrophages. Ces cellules sont présentes en grand nombre dans des

poumons normaux et contiennent de nombreuses particules phagocytées d'origine exogène et endogène. Quelques minutes après leur inhalation, les particules peuvent être retrouvées dans les macrophages alvéolaires.

Il est à noter que les particules phagocytées migrent vers l'épithélium cilié ou le système lymphatique à des taux variables allant de 2 à 6 semaines.

- Troisièmement, certaines particules peuvent pénétrer directement dans le sang ou le système lymphatique :

Pour les particules de petite taille, dont la dimension se rapproche de celle des molécules de gaz, la diffusion à travers l'épithélium alvéolaire est capable d'expliquer la pénétration dans le sang. En effet, tout comme les gaz, les aérosols liquides et les particules solubles peuvent être absorbées dans le sang après avoir franchi l'épithélium alvéolaire.

Il faut également noter que la solubilisation peut être un moyen par lequel une substance est éliminée des poumons (158). En effet, certaines particules pénétrant dans la région alvéolaire peuvent être éliminées par dissolution et transport vasculaire. Dans cette région, les cellules sont tapissées par un fin film de fluide. L'environnement aqueux fourni par ce liquide de surface favorise une dissolution partielle et éventuellement une absorption des particules hydrosolubles, notamment celles présentes sous forme de gouttelettes liquides.

Le taux de clairance au niveau des poumons peut donc être prédit par la solubilité du composé dans les fluides pulmonaires. Plus cette solubilité est faible, plus le taux d'élimination est petit .

Quant à la capture par les vaisseaux lymphatiques, elle se produit suite au passage des particules à travers l'épithélium alvéolaire par diffusion directe et à la migration vers le site des vaisseaux lymphatiques. Les cellules endothéliales tapissant les capillaires lymphatiques sont perméables aux particules. Le système lymphatique joue un rôle fondamental dans la collecte de la matière particulaire provenant de l'interstitium ou des espaces alvéolaires. La matière particulaire peut rester dans le tissu lymphatique pendant de longues périodes.

6.3. CAS DES ATMOSPHERES MIXTES

Dans l'environnement, le foyer ou sur le lieu de travail en ce qui concerne l'homme, l'inhalation concerne en général un mélange d'agents chimiques aériens qui inclut fréquemment à la fois des agents gazeux et particulaires. On parle d'atmosphère mixte.

Dans ce cas, la matière particulaire sert de transporteur pour les gaz et vapeurs adsorbés à la surface des particules solides ou dissoutes à l'intérieur de particules liquides. Ceci augmente le temps de résidence de tels polluants dans des zones spécifiques des poumons et impose une tâche supplémentaire aux mécanismes de défense pulmonaire.

Les gaz et vapeurs sont alors transportés par ces particules au niveau de sites potentiels de lésion dans les poumons. Le modèle et le site de dépôt des gaz ou vapeurs sont alors influencés par les règles qui régissent le dépôt des particules.

Ainsi, dans des atmosphères mixtes, le type de dépôt des particules influence le site d'action ou le site d'absorption des gaz et des vapeurs adsorbés sur ces particules. De même, les effets des gaz et vapeurs sur les éléments parenchymateux influencent la réponse cellulaire aux particules.

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA TOXICITE PAR INHALATION :

MODALITES

Nous allons désormais abordé les modalités expérimentales des études de toxicité par inhalation. Lorsqu'un toxique est inhalé, la cible majeure de ce dernier est le système respiratoire. Différents mécanismes de toxicité sont alors possibles :

1. MECANISMES DE TOXICITE (30, 42, 44, 54, 56, 57, 71, 130, 132, 145, 176, 229, 255)

Un dommage toxique au niveau pulmonaire est une série extrêmement compliquée d'évènements étroitement liés et interdépendants.

Premièrement, une lésion pulmonaire peut être provoquée par différents mécanismes tels que :

- Des dommages osmotiques ou cytolytiques au niveau des membranes cellulaires,
- Le métabolisme d'agents chimiques exogènes qui permet d'obtenir des intermédiaires réactifs potentiellement capables d'interagir avec des cibles intracellulaires ou
- Des dommages oxydatifs au niveau des composés cellulaires par la formation d'espèces réactives oxygénées.

La lésion primaire pulmonaire est souvent amplifiée par des évènements secondaires comme la formation et la libération de médiateurs (par exemple, des amines vasoactives et des leucotriènes (69, 134)), l'activation de kinines et de la cascade du complément, la libération d'enzymes lysosomales et l'activation de cellules inflammatoires.

Une lésion ou une mort cellulaire ainsi que la transformation de cellules normales en cellules présentant un comportement biologique anormal (une transformation maligne, par exemple) sont des réponses communes de nombreux organes à la présence d'agents toxiques. Des études mécanistes mises en place pour caractériser les événements physico-chimiques accompagnant le développement de telles lésions ont été réalisées en premier lieu sur le foie. Il apparaît que de nombreux mécanismes valables pour les phénomènes d'hépatotoxicité sont également impliqués dans le développement de lésions pulmonaires aiguës ou chroniques.

Cependant, des différences doivent être considérées entre le foie et les poumons lors de la conception, l'interprétation et l'extrapolation de telles études. En effet, comparé au foie, le système respiratoire est un système plus hétérogène car il est composé d'une grande variété de types cellulaires.

Les mécanismes de toxicité sont directement liés aux propriétés physico-chimiques des agents inhalés et/ou à leur capacité à induire une réponse immunitaire.

1.1. TOXICITE DIRECTE(34)

Beaucoup d'agents aériens produisent une lésion au niveau de l'appareil respiratoire par interaction directe de la molécule réactive avec sa cible cellulaire. Des exemples sont les gaz oxydants et irritants comme l'ozone, le phosgène, l'acide hydrochlorique et beaucoup d'autres fumées ou gaz.

Ces gaz peuvent produire des changements cytolitiques directement au niveau de leur site de première interaction, la membrane cellulaire exposée, ou augmenter la production et l'accumulation d'espèces réactives oxygénées et donc provoquer une lésion cellulaire (230). Les lésions causées par des dérivés réactifs oxygénés semblent être un mécanisme important dans les dommages respiratoires toxiques en ce qui concerne les gaz tels que l'ozone.

De plus, des cellules inflammatoires, en particulier les macrophages et les polynucléaires, peuvent être recrutés dans le parenchyme pulmonaire. Par le biais d'une stimulation appropriée, ces cellules peuvent subir une activation et produire une grande quantité de dérivés oxygénés qui, en retour, peuvent endommager les cellules respiratoires (248).

1.2. ACTIVATION METABOLIQUE(15, 24, 25, 162)

Comme nous l'avons abordé précédemment, le site de dépôt des toxiques inhalés joue sur la façon dont ils seront éliminés, mais influence aussi leur sort métabolique.

De nombreuses informations sont disponibles concernant le rôle de l'activation métabolique des xénobiotiques en toxicité par inhalation.

Tous les segments du système respiratoire, des cavités nasales à la périphérie du compartiment pulmonaire, contiennent des enzymes capables de métaboliser des xénobiotiques. Ces enzymes sont capables de métaboliser des composés en produits moins toxiques, tandis que certains métabolites s'avèrent être plus toxiques que le composé chimique initialement inhalé.

De façon générale, le composé parental atteint le tractus respiratoire par inhalation. Ce composé subit une activation métabolique pour obtenir un nouveau composé.

Une interaction avec la cible se manifeste souvent par la formation d'une liaison covalente entre le métabolite réactif et les macromolécules cellulaires. L'activation par les enzymes des cytochromes P 450 est un élément clé du processus.

D'un autre côté, les systèmes protecteurs tels que le glutathion et certaines enzymes à l'intérieur de la cellule sont des composants cruciaux de la protection.

1.3. TOXICITE MEDIEE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE(127, 128, 236)

Comme nous l'avons expliqué précédemment, des mécanismes à la fois physiques et immunologiques sont impliqués dans les mécanismes de défense pulmonaire contre les agents chimiques et infectieux. Cependant, la réponse immunitaire peut entraîner un effet délétère si des réactions d'hypersensibilité, une immunosuppression ou des lésions enzymatiques se produisent.

Les phénomènes d'hypersensibilité ou d'allergie sont les types les plus communs de maladies respiratoires médiées par le système immunitaire et causées par l'inhalation d'agents. Les quatre types de réactions d'hypersensibilité sont : les types I (anaphylactique), II (cytotoxique), III (type Arthus) qui font intervenir des anticorps, tandis que le type IV (hypersensibilité retardée) implique des cellules. Les types les plus communs de réactions d'hypersensibilité documentées concernant l'appareil respiratoire sont les types I et III.

L'hypersensibilité de type I se manifeste par une rhinite (inflammation de la muqueuse nasale) ou une bronchoconstriction. Une exposition initiale à un allergène ou un agent sensibilisant provoque la formation d'IgE qui se fixent sur les mastocytes et les basophiles. Une exposition ultérieure à l'allergène déclenche une dégranulation des mastocytes et donc la libération d'amines vaso-actives et d'autres médiateurs. Un exemple d'agent chimique qui induit une réaction d'hypersensibilité de type I est le toluène.

L'hypersensibilité de type III se manifeste par une pneumopathie nommée alvéolite extrinsèque allergique. Elle résulte du dépôt de complexe antigène-anticorps et de complément au niveau des poumons, qui, en retour, entraîne une inflammation. Les agents chimiques qui produisent une réaction d'hypersensibilité de type III incluent les poussières organiques.

L'hypersensibilité de type IV se produit lorsque des lymphocytes T induisent une réaction de type cellulaire après un temps de latence. Un exemple est la réaction granulomateuse induite par le béryllium.

Une immunosuppression peut être la conséquence de certains gaz oxydants ou de la fumée de cigarette. Elle se manifeste par une diminution de la résistance de l'hôte aux agents infectieux ou aux cellules néoplasiques.

Enfin, certains agents chimiques peuvent induire des maladies pulmonaires qui ressemblent à des maladies immunologiques. Ils stimulent des récepteurs épithéliaux sensibles à l'irritation ce qui aboutit à une sécrétion de médiateurs inflammatoires en l'absence d'implication d'anticorps.

Il en résulte une réaction pseudo-allergique qui ressemble à un phénomène d'hypersensibilité immédiate ou de type I. Une telle irritation non spécifique des conduits aérifères est nommée syndrome d'hyperréactivité des conduits aérifères. Ce syndrome d'hyperréactivité des conduits aérifères se définit comme une augmentation de la sensibilité bronchique aux substances inhalées qui peuvent, en fonction de la dose, produire une obstruction des conduits aérifères. Par exemple, ce syndrome peut être causé par le formaldéhyde.

1.4. INTERACTIONS ENTRE LES XENOBIOTIQUES (256)

Des interactions toxicologiques peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse des lésions pulmonaires. L'inhalation de deux aérosols différents, de façon simultanée ou espacée, peut produire des lésions plus ou moins sévères que celles rencontrées lors de l'inhalation d'un seul de ces deux aérosols. Il est bien connu que l'association du dioxyde de soufre avec certains aérosols salés peut agir de façon synergique pour endommager la fonction pulmonaire. De même, il a été démontré que l'exposition concomitante de l'ozone avec des aérosols acides augmente le développement d'une fibrose pulmonaire. Celle-ci sera plus importante que celle rencontrée dans le cas de l'exposition à un seul de ces agents. Il est très important de noter que de telles interactions peuvent se produire à des niveaux de polluants qui sont ceux rencontrés dans l'environnement.

A l'opposé, des interactions entre des inhalants peuvent atténuer occasionnellement leur toxicité. Un exemple est la neutralisation des fumées acides par l'ammoniac.

2. LES DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DE LA TOXICITE DES XENOBIOTIQUES AERIENS AU NIVEAU DU SYSTEME RESPIRATOIRE (91, 116)

Il existe différents types d'approches utilisés pour estimer les réponses du système respiratoire suite à l'inhalation d'agents toxiques :

- Les études épidémiologiques,
- L'étude d'expositions cliniques contrôlées,
- Les études réalisées sur des animaux de laboratoire et
- Les études *in vitro*.

En général, une base de données contenant les résultats de ces multiples catégories d'études est nécessaire pour surmonter les inconvénients de chaque approche.

2.1. LES ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES CONTROLEES

Les études épidémiologiques réalisées chez l'homme ont pour but de démontrer une association entre une exposition et des phénomènes de mortalité et de morbidité ou l'incidence d'une maladie spécifique. Ces études permettent une déduction directe du risque pour l'homme puisque des conditions d'exposition réelles, telles que la présence d'un mélange chimique approprié, sont impliquées.

Les études impliquant des expositions environnementales de la population entière ont l'avantage d'inclure des sous-populations sensibles. Les inconvénients des études épidémiologiques sont leur information incomplète et limitée concernant l'exposition comme par exemple les agents chimiques réellement impliqués et leur concentration. Par conséquent, l'évaluation de la relation dose-réponse et la détermination de limites d'exposition acceptables est difficile. De même, il existe de nombreux biais en raison de l'exposition à de multiples agents chimiques qui peuvent interagir entre eux. Enfin,

lors des études épidémiologiques, les effets sont pris en compte seulement quand des phénomènes de morbidité ou de mortalité sont notées.

Concernant les études cliniques contrôlées, elles utilisent des individus volontaires et sont fréquemment utilisées pour évaluer les effets sur l'homme d'exposition à des polluants atmosphériques à de faibles concentrations.

L'avantage de cette méthode est que l'homme constitue la population d'exposition. De plus, il est possible de définir et de contrôler finement les concentrations d'exposition. Cependant, puisque la sécurité des sujets soumis à l'expérimentation est primordiale, seules les expositions à court terme et à faibles concentrations, qui engendrent des effets légers et transitoires, sont étudiées.

2.2. LES ETUDES REALISEES EN EXPERIMENTATION ANIMALE (51, 54, 184)

Le but des essais toxicologiques réalisés sur l'animal est de protéger les hommes des effets délétères causés par l'inhalation d'agents toxiques aériens lorsqu'une toxicité est mise en évidence sur un modèle animal.

De nos jours, l'utilisation des animaux lors des essais toxicologiques reste essentielle pour assurer les progrès qui restent à faire dans la compréhension des processus toxicologiques résultant de l'inhalation de certains agents aériens.

En expérimentation animale, l'utilisation de nombreuses espèces dont le chien a permis de mettre à jour la responsabilité de l'amiante et de la fumée de cigarettes dans l'apparition de cancer (36, 94, 119, 198).

Les études animales permettent une flexibilité maximale dans le choix des agents chimiques, des concentrations et des régimes d'exposition, des prélèvements biologiques et des espèces testées. Les conditions d'exposition peuvent être rigoureusement contrôlées et aisément manipulées. Les expositions peuvent être aiguës, subchroniques ou chroniques comme nous l'expliquerons plus tard (cf 3ème partie, paragraphe 1).

Ces études peuvent être utilisées pour tenter d'élucider les mécanismes d'action et l'existence de différences interspécifiques dans la réponse toxicologique. De nombreux types de réponses biologiques peuvent être évalués (cf 3ème partie, paragraphe 2).

En plus de leur rôle fondamental dans la protection de la santé publique, les études effectuées sur les animaux servent à guider les scientifiques lors de l'estimation du risque. En effet, il n'existe pas de données suffisantes permettant de mettre en place des limites d'exposition pour un grand nombre d'agents chimiques dont l'inhalation présente un risque potentiel pour l'homme. Hors, les effets de l'exposition à long terme à des polluants atmosphériques sont difficiles à évaluer en utilisant des données humaines puisque, en épidémiologie, l'historique de l'exposition et certains facteurs d'interaction ne peuvent être contrôlés. De plus, seulement des expositions à court terme sont possibles en études cliniques. Par conséquent, seules les études d'exposition à long terme utilisant des animaux de laboratoire fournissent des informations pouvant être utilisées pour prédire les effets humains.

Cependant, l'estimation du risque pour l'homme à partir de l'utilisation de données provenant de l'exposition d'animaux de laboratoire est compliquée du fait des problèmes posés par l'extrapolation des données obtenues sur l'animal à l'homme. Les différences concernant

les processus biochimiques et pharmacocinétiques de l'animal et de l'homme peuvent diminuer la pertinence des modèles animaux. De même, les processus de détoxification et les capacités de métabolisation des xénobiotiques du système respiratoire ainsi que la localisation de ces activités peuvent différer d'une espèce à l'autre et dépendre du niveau d'exposition. L'extrapolation d'expositions animales à haute concentration à des niveaux d'exposition réalistes dans l'environnement humain pose un sérieux problème pour l'estimation du risque.

Ainsi, les types d'études que nous venons de passer en revue possèdent des avantages et des inconvénients intrinsèques résumés dans le tableau 1 ci-dessous :

| | Etudes épidémiologiques | Etudes cliniques contrôlées | Etudes sur l'animal |
|--|---|---|--|
| Conditions d'exposition | + Concentrations réalistes + Interactions chimiques réelles - Information limitée ou incomplète concernant l'exposition (agents chimiques impliqués et leur concentration) - Présence de biais causés par l'exposition à de multiples agents chimiques | + Conditions d'exposition bien définies et contrôlées - Limitées à des expositions à court terme avec de faibles concentrations en polluants | + Conditions d'exposition bien définies + Grande gamme de concentrations possibles + Contrôle aisé de l'exposition |
| Temps d'exposition | + Réaliste, aigu à chronique | - Uniquement à court terme | + Aigu à chronique - La pertinence du type/durée de l'exposition est contestable |
| Effets toxicologiques | - Effets limités à sévères (mortalité, morbidité) | + Subtils, les effets moins sévères sont mesurables - Seulement des effets légers et réversibles, rendant contestable la signification toxicologique | + Une grande variété de réponses peuvent être étudiées - L'extrapolation de certains effets subtils à l'homme est incertain |
| Caractéristiques de la population | + Mesures faites sur l'homme + Grande taille de population possible + Plusieurs catégories de sous-populations sensibles possibles | + Mesures faites sur l'homme - Nombre limité de sujets (volontaires) - Possibilité d'étudier des sous-populations sensibles | - Extrapolation à l'homme + Possibilité d'étudier un grand nombre d'animaux |
| Utilité | - Evaluation difficile de la relation dose-réponse - Pas d'information sur le mécanisme d'action - Coûteux et long | + La relation dose-réponse peut être testée - Information limitée sur le mécanisme d'action - Très coûteux | - Une grande variété de dose-réponse peut être testée - Recherche possible des mécanismes d'action - Coût plus faible |

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des avantages (+) et des inconvénients (-) des différentes méthodes d'évaluation de la toxicité par inhalation (92).

2.3. LES METHODES *IN VITRO* (84, 194, 249, 252, 263, 264)

En clinique, la radiographie et les tests de fonction respiratoire sont les méthodes les plus fréquemment utilisées chez le chien pour estimer l'état structural et fonctionnel des poumons. Pour cette raison, les altérations de la fonction pulmonaire sont rarement détectées avant que l'architecture pulmonaire soit suffisamment endommagée pour modifier l'apparence radiographique ou les échanges gazeux.

Les chercheurs développent de plus en plus l'utilisation de méthodes d'évaluation de la toxicité *in vitro* dans le but d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement de lésions toxiques au niveau des poumons. En théorie, de telles techniques permettent au scientifique d'étudier l'action du toxique au niveau des cellules pulmonaires dans un environnement mieux défini que ce qui se produit chez un animal vivant.

De plus, les études *in vitro* peuvent être utiles pour passer au crible un grand nombre d'agents chimiques responsables d'effets spécifiques tels que la génotoxicité ou la cytotoxicité ou pour mettre en évidence les mécanismes d'action.

Les études *in vitro* fournissent également des informations permettant d'interpréter les données fournies par l'exposition animale ou humaine en termes d'estimation du risque.

Différents types de système *in vitro* ont été conçus afin d'étudier de façon plus approfondie les effets des toxiques sur le système respiratoire comme par exemple des explants trachéaux (138), des poumons perfusés (12, 83, 206), des explants et des coupes pulmonaires (181, 190, 214, 228, 240), des techniques de microdissection des conduits aérifères (193) ou l'isolement de diverses cellules du système respiratoire (81, 153).

Il est difficile d'isoler et de maintenir en culture des populations cellulaires pulmonaires du fait de cette hétérogénéité du tissu pulmonaire. Les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales de type II, les cellules de Clara, les cellules épithéliales aérifères et les cellules endothéliales ont été étudiées *in vitro*. Cependant, la majorité de la surface alvéolaire est composée de cellules épithéliales de type I qui semblent être la cible principale de nombreux toxiques pulmonaires. Les méthodes d'isolement et de culture des cellules de type I ne sont pas aussi bien développées que pour les autres cellules.

Les méthodes *in vitro* possèdent de nombreux inconvénients. Tout d'abord, elles ne peuvent en aucun cas remplacer un être vivant. En effet, ces méthodes alternatives ne peuvent pas être utilisées pour modéliser les interactions complexes et les processus de rétrocontrôle se produisant entre les cellules, les tissus et les organes d'un organisme mammalien fonctionnel ou les processus complexes de dépôt, de fixation et de clairance au niveau du système respiratoire.

De plus, ces méthodes sont limitées par la courte durée de vie des cultures, le choix des paramètres révélateurs de la toxicité et le fait qu'il s'agisse de systèmes isolés.

Enfin, il est à noter qu'actuellement aucune méthode *in vitro* n'est validée au niveau réglementaire.

Tout ceci nous conduit à penser que l'utilisation des animaux lors des essais toxicologiques reste incontournable. Nous allons désormais préciser quelles sont les espèces utilisées lors des essais de toxicologie par inhalation et l'intérêt de l'utilisation des chiens.

3. DIFFERENTES ESPECES ANIMALES UTILISEES EN TOXICOLOGIE PAR INHALATION ET DOSE

3.1. LES ESPECES ANIMALES UTILISEES (39, 99)

Le choix de l'espèce animale choisie pour une étude de toxicité par inhalation est fondamental et capital. Il est évident qu'il n'existe pas de substitut idéal de l'homme mais chaque espèce présente ses propres avantages et inconvénients.

Le choix de l'espèce animale utilisée pour évaluer la toxicité potentielle de certains composés au niveau du système respiratoire est basée sur les ressemblances anatomiques entre le système respiratoire de l'homme et de l'espèce animale. Dans les études par inhalation, la sélection d'animaux possédant un système respiratoire semblable à celui de l'homme est particulièrement intéressant. Un autre critère pris en compte dans ce choix correspond à la similitude des réponses biochimiques et physiologiques avec celles de l'homme et l'importance de données expérimentales permettant la comparaison des toxicités de différents agents chimiques.

En pratique, la sélection des espèces test est souvent basée sur certains critères comme la taille, la disponibilité et les dépenses nécessaires à l'obtention et l'utilisation des animaux. De plus, il faut considérer les informations de base disponibles, les caractéristiques structuraux et fonctionnels du système respiratoire et le type de réponse anticipée. Ces données permettent au chercheur de déterminer le nombre d'animaux nécessaires, la durée de l'étude et les contrôles appropriés.

Le choix du modèle animal est rarement évident, un compromis fréquemment mis en place est l'utilisation de multiples espèces (100). Par exemple, cette approche a été utilisée pour tester les radionucléides (141).

Lors des essais de toxicologie par inhalation, les animaux expérimentaux les plus couramment utilisés sont les rats, les chiens et les singes, quelquefois les hamsters, les cobayes et les lapins.

3.1.1. Rongeurs

La plupart du temps et dans la majorité des cas, les rongeurs, tels que les rats, les souris, les cobayes et les hamsters, sont utilisés. L'utilisation étendue des rongeurs en toxicologie par inhalation a fourni de nombreuses informations de base pour les scientifiques.

En pratique, l'avantage de l'utilisation des rongeurs est leur petite taille qui permet de tester d'importants groupes d'animaux et la facilité avec laquelle on peut se les procurer. De même, leur acquisition et leur entretien nécessitent un coût relativement faible. Leur relative courte espérance de vie permet des tests durant toute leur durée de vie et donc une approche raisonnable de l'évaluation de la toxicité chronique et des essais biologiques de cancérogenèse.

Cependant, il existe de nombreux inconvénients à l'utilisation des rongeurs pour prédire les effets sur l'homme. En effet, l'anatomie de la région naso-pharyngée avec ses

chambres antérieures tortueuses et donc le dépôt particulaire dans cette région sont très différents de ceux de l'homme. Contrairement à l'homme, ces espèces présentent une respiration uniquement de type nasale avec un filtre nasal supérieur très efficace. Enfin, l'estimation de la fonction pulmonaire est difficile sur des rongeurs non anesthésiés bien que la miniaturisation de sondes et de détecteurs ont permis de nombreux succès.

3.1.1.1. Rat

En raison de leur taille et de leur disponibilité, les rats de laboratoire sont les espèces les plus largement utilisées dans les études de toxicité par inhalation à la fois en aigu et en chronique.

Le problème le plus sérieux rencontrés dans cette espèce est la présence de nombreuses infections respiratoires spontanées (45). Cependant, la disponibilité de rats exempts de pathogène (pas d'anticorps contre les virus et les mycoplasmes) a permis de surmonter ce problème. De ce fait, leur longévité augmentée (supérieure à deux ans) a été fondamentale lorsque l'on considère que la période de latence de certaines tumeurs pulmonaires provoquées par quelques agents chimiques peut être supérieure à deux ans. Il s'agit d'une considération importante dans la conception des études de cancérogenèse (175).

Les inconvénients majeurs de l'utilisation des rats en expérimentation sont leurs différences fondamentales avec l'homme en ce qui concerne leur anatomie respiratoire (par exemple, l'absence de bronchiole respiratoire) et leur fonction respiratoire (les rats possèdent une respiration purement nasale). Ceci peut compliquer l'extrapolation des effets observés à l'homme.

3.1.1.2. Hamster

En raison de leur résistance aux infections pulmonaires, les hamsters dorés sont devenus l'espèce de choix pour l'étude de la cancérogenèse pulmonaire dans certains laboratoires.

Les inconvénients liés à leur utilisation sont leur grande résistance à l'induction de néoplasmes pulmonaires par des expositions par inhalation et leur courte espérance de vie.

3.1.1.3. Cobaye

Les cobayes sont les animaux de choix pour l'évaluation de la réactivité des conduits aérifères et pour l'étude des lésions pulmonaires d'origine immunologique.

3.1.2. Lagomorphes

Les lapins sont souvent utilisés pour les préparations de poumons perfusés et pour l'isolement de populations de cellules pulmonaires bien définies dans des rendements acceptables.

De nombreuses études mesurant la clairance des particules inhalées au niveau des conduits aérifères et des régions profondes des poumons ont aussi été réalisées sur les lapins.

3.1.3. Primates

Le système respiratoire des singes ressemble de très près à celui des hommes. Cependant, la disponibilité et le coût de ces animaux et la nécessité de dispositifs spéciaux et spacieux pour les loger sans oublier des considérations éthiques à l'égard du confinement des primates dans de petites chambres d'exposition durant des périodes prolongées, limitent sévèrement l'usage des primates.

Les données concernant les dommages toxiques pulmonaires chez les primates ressembleraient vraisemblablement le plus à ce que l'on peut anticiper chez l'homme. Des données sont disponibles concernant des lésions aiguës et chroniques produites au niveau des poumons des primates par l'oxygène, l'ozone et la fumée de cigarette.

3.1.4. Chiens

De nombreuses études de toxicité par inhalation utilisent comme animal test des chiens, en particulier des beagles.

Les chiens sont largement utilisés dans ces essais toxicologiques en raison de leur taille commode pour un grand nombre de mesures de laboratoire (incluant l'évaluation de la fonction pulmonaire (cf 3ème partie, paragraphe 3.1.)), de leur tempérament coopératif et des similitudes avec l'homme concernant le dépôt pulmonaire des aérosols et leur structure bronchiolaire.

Une grande diversité de maladies existent à l'état naturel chez le chien faisant de celui-ci un bon modèle pour l'évaluation de l'impact de certains agents toxiques aériens.

Les chiens ont été notamment utilisés pour étudier le pouvoir cancérogène de l'amiante et de la fumée de cigarette (36, 94, 119, 198).

Le coût et les installations nécessaires pour prendre soin correctement des chiens représentent un désavantage mineur. De plus, l'anatomie nasale du chien et le type pulmonaire sont différents de ceux des hommes.

3.2. DOSE

3.2.1. Définition de la dose

3.2.1.1. Différences entre les termes *concentration* et *dose*

Il existe de nombreuses confusions dans l'utilisation des termes concentration et dose.

La concentration est le niveau de polluant présent dans l'air et susceptible d'être inhalé. La concentration atmosphérique d'un agent chimique ne correspond pas à la dose totale d'agent distribué au niveau de sites spécifiques de l'organisme.

En expérimentation, la concentration nominale se définit comme la quantité de produit injecté dans le système générateur divisée par le débit de l'air dans l'enceinte. Celle-ci n'est pas équivalente à la concentration réelle qui est déterminée par l'analyse d'échantillons d'air collectés dans l'enceinte à proximité des zones où respire le chien (cf 4.2.).

La concentration réelle varie au cours de la période d'exposition, il est par conséquent nécessaire d'analyser plusieurs échantillons collectés à différents intervalles de temps. L'installation expérimentale doit être telle que l'étendue des variations soit la plus faible possible.

L'OMS fournit de nombreuses références concernant les systèmes d'exposition, les systèmes générateurs ou les méthodes d'échantillonnage (250).

Les concentrations de gaz, vapeurs ou aérosols sont exprimées en pour cent, parties par million, ou parties par milliard.

Quand une atmosphère est introduite dans une chambre, un délai est nécessaire pour atteindre la concentration calculée. Si un bon mélange est obtenu, la concentration C_t au temps t est donnée par l'équation suivante (226) :

$$t = V/F \log_e(C/C - C_t)$$

où C est la concentration calculée, F est le débit de l'air en litres par minute et V est le volume de la chambre en litres.

Dans la majorité des essais toxicologiques, le paramètre le plus important est la dose administrée à l'animal de laboratoire.

De façon générale, la dose se définit comme la quantité de substance administrée à un organisme.

En toxicologie par inhalation, elle représente la quantité de polluant qui est déposée ou absorbée au niveau du système respiratoire d'un individu exposé à une atmosphère donnée pendant une durée spécifique. La dose reçue dépend des propriétés physico-chimiques de la substance inhalée, de la condition physiologique de l'animal test et des facteurs impliqués dans le dépôt et la clairance de la substance.

La dose est considérée comme administrée si l'agent pénètre et reste dans le système respiratoire indépendamment de son absorption.

Pour qu'une substance présente dans l'air inhalé exerce des effets toxiques, une dose significative doit se déposer sur des tissus sensibles.

3.2.1.2. Dose interne et dose biologique effective

La dose peut être scindée en deux composantes : la dose interne et la dose biologique effective.

- La dose interne est la quantité de polluant qui est absorbée dans l'organisme durant un temps donné.

- La dose biologique effective est la quantité de polluant ou de ses métabolites qui ont interagi avec un site cible pendant une durée donnée, conduisant ainsi à une altération d'une fonction physiologique. La connaissance de la dose au niveau du site cible initial fournit un lien crucial entre l'exposition et la réponse biologique qui en résulte.

La conséquence de l'atteinte de l'agent toxique au niveau du site cible est gouvernée par son comportement pharmacocinétique. Ceci inclut les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination. Par exemple, dans le cas de l'inhalation de particules, la dose effective dans le tractus respiratoire est proportionnelle à la rétention des particules. La rétention des particules dérive de la balance de deux processus : le dépôt et la clairance.

3.2.2. Détermination de la dose

Sa détermination est aisée lorsque le composé est administré par voie orale, intraveineuse, sous-cutanée ou intrapéritonéale. Contrairement à ces modes d'administration, il est difficile de déterminer la dose reçue par l'animal en toxicologie par inhalation car elle dépend de nombreux facteurs. Les principaux facteurs sont :

- La concentration atmosphérique (C)
- Le temps d'exposition (T)
- Les caractéristiques physiologiques pulmonaires de l'espèce test durant la période d'exposition (I)
- Les modèles d'absorption ou de dépôt de l'agent toxique testé (2).

Il apparaît que la dose est liée au produit de la concentration (C) et de la durée de l'exposition (T), et ceci quelque soit le type d'exposition à condition que les facteurs (I) et (2) demeurent constants au cours de l'exposition. De ce fait, la prédiction des effets biologiques causés par l'inhalation de polluants est souvent basée sur l'étude concentration-temps.

Dans les études de toxicité par inhalation, la dose s'exprime en général en utilisant les termes de concentration et de durée d'exposition. Par exemple, les chiens ont été exposés à x ppm d'agent chimique y durant z heures par jour au cours d'un nombre donné de jours, semaines, mois...

Le produit $C \times T$ est communément utilisé pour relier l'exposition à l'importance de la réponse toxique et fait référence à la loi de Haber (97). Ce toxicologiste a comparé la létalité de différents gaz de combat. Plus tard, Witschi (260), trouva de nombreuses lois gouvernant la toxicologie par inhalation.

3.2.3. La loi de Haber

L'équation assimilée à la loi de Haber statue que le produit de la concentration (C) et du temps d'exposition (T) requis pour produire un effet physiologique spécifique est égal à une constante K spécifique de l'agent toxique :

$$C \times T = K.$$

Il a été établi que la réponse est la même pour un produit $C \times T$ constant.

3.2.3.1. Influence de la concentration et du temps d'exposition

Cette formule est vérifiée seulement pour certaines combinaisons de concentration et de temps d'exposition et pour un nombre limité de substances. Par exemple, cette loi ne se vérifie pas lorsque C et T ont des valeurs extrêmes. En effet, si C est très faible, il n'y aura pas de réponse quelle que soit la durée de l'exposition.

Une expression générale plus appropriée pour estimer $C \times T = K$ serait donnée par :

$$C^a \times T^b = K$$

Où les exposants a et b sont estimés à partir de certaines données. Une telle formule nous démontre que C et T ne contribuent pas de la même façon à la toxicité observée.

3.2.3.2. Influence de la nature de l'agent toxique

Dans de nombreux cas, notamment lors des expositions de courte durée à des composés, tels que le phosgène, qui ont une action directe majeure sur le système pulmonaire, l'effet toxique observé suit étroitement les lois de Haber, c'est-à-dire que la réponse d'un animal à un polluant atmosphérique est directement proportionnelle au produit $C \times T$.

Cependant, la connaissance sans cesse accrue des mécanismes de toxicité et de la relation qui existe entre la concentration et le temps d'exposition a permis de démontrer que de nombreux toxiques ne suivent pas la loi de Haber.

Ceci est fréquemment rencontré avec les composés qui possèdent une toxicité systémique. Une telle toxicité dépend d'une combinaison de processus tels que l'assimilation par le système respiratoire, la distribution tissulaire, le métabolisme par les organes cibles potentiels et l'élimination. Beaucoup de ces processus peuvent être très efficaces à de faibles concentrations mais saturables à de fortes concentrations. Par conséquent, une relation non linéaire existe entre la concentration, le temps et les effets toxiques.

3.2.4. Influence des paramètres respiratoires sur la dose

Les paramètres respiratoires d'un animal gouvernent le volume d'air inhalé et donc la quantité de substance test pénétrant dans le système respiratoire. La profondeur et la fréquence respiratoires influencent notamment la dose de substances aériennes reçues.

Les différents paramètres respiratoires de l'homme et du chien sont comparés dans le tableau 2 ci-dessous :

| Espèces | Poids corporel | Volume pulmonaire (mL) | Volume minute (mL/min) | Surface alvéolaire (m ²) | Volume pulmonaire | Volume minute | Volume minute |
|--------------|----------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | | | Surface alvéolaire (%) | Volume pulmonaire (%) | Surface alvéolaire (%) |
| Chien | 22.8 | 1501 | 2923 | 90 | 16.7 | 1.95 | 33 |
| Homme | 75 | 7000 | 6000 | 82 | 85.4 | 0.86 | 73 |

Tableau 2 : Comparaison des paramètres respiratoires du chien et de l'homme (10).

Les rapports (trois dernières colonnes du tableau) nous permettent de nous rendre compte qu'un chien inhale approximativement 2 fois le volume contenu dans ses poumons en une minute tandis que l'homme inhale un peu moins du volume contenu dans ses poumons durant la même durée. Ceci implique que la dose par unité de volume pulmonaire est plus de 2 fois supérieure chez le chien que chez l'homme pour une même concentration atmosphérique inhalée.

De plus, le volume minute du chien est en contact avec 2 fois plus de surface alvéolaire que l'homme, donc la dose par unité de surface est plus de 2 fois inférieure à celle de l'homme.

Le volume pulmonaire comparé à la surface alvéolaire est beaucoup moins important chez le chien que chez l'homme ce qui signifie que l'étendue du contact des gaz inhalés avec la surface alvéolaire est plus importante dans l'espèce canine.

En pratique courante, il est important de se référer dès que cela est possible aux paramètres respiratoires standards de l'espèce afin de calculer la dose inhalée et la dose déposée au cours du temps.

Le processus de ventilation est contrôlé par une grande variété de stimuli physico-chimiques internes ou externes qui peuvent être affectés par l'inhalation d'un agent chimique. Ceci aura pour conséquence une modification du modèle respiratoire de l'animal.

L'exemple le plus connu est l'action des agents chimiques irritants au niveau du système respiratoire. L'analyse du modèle respiratoire a été largement utilisée pour estimer les effets de ces irritants. Cette technique permet notamment de différencier les irritants sensoriels ou du système respiratoire supérieur, des irritants pulmonaires.

Les agents qui causent une irritation du système respiratoire supérieur sont qualifiés d'irritants sensoriels (35). Ce sont des composés très hydrosolubles tels que l'ammoniac, le chlore ou le formaldéhyde. De nombreuses vapeurs organiques produisent également une irritation des conduits aérifères. C'est le cas par exemple des alcanes halogénés (bromotrichlorométhane), des aldéhydes (acroléine), des isocyanates aliphatiques (isocyanate de méthyle).

Une diminution de la fréquence respiratoire se produit lors d'irritation du système respiratoire supérieur (178). Cette diminution peut atteindre plus de 80%. Ceci a été étudié en détails par Alarie et constitue la base des essais qui permettent la comparaison quantitative de l'effet irritant des différents composés (4, 5, 6, 7). Il s'agit d'un mécanisme de réflexe protecteur qui a pour but de limiter la pénétration des irritants dans le système respiratoire inférieur.

Ce phénomène résulte d'une pause réflexe durant le cycle respiratoire. En effet, la substance inhalée stimule les terminaisons du nerf trijumeau situées au niveau des passages nasaux. La durée de cette pause et donc la diminution de la fréquence respiratoire dépendent de la dose, permettant ainsi de déterminer une relation dose-réponse.

De nombreux types de récepteurs sensibles aux irritants ont été également identifiés dans les poumons. Les irritants pulmonaires sont moins hydrosolubles ou, dans le cas des aérosols, possèdent un faible diamètre particulaire. Les exemples sont l'ozone, le dioxyde de soufre et les oxydes de métal tels que le cadmium ou le béryllium.

Lorsque les récepteurs sont stimulés, il en résulte une augmentation de la fréquence respiratoire qui est en général accompagnée d'une diminution du volume courant, ce qui a pour but d'éviter la pénétration des irritants dans la partie profonde des poumons et donc de limiter leur action (73). Une telle réponse peut servir de base à la méthode utilisée pour estimer une irritation pulmonaire aiguë. Dans le but d'estimer cette réponse, il est en général nécessaire de réaliser un by-pass des voies respiratoires supérieures grâce à une trachéotomie sur un animal anesthésié. Le chien est un animal particulièrement sensible à l'irritation pulmonaire, c'est donc une espèce de choix utilisée pour ce type de test.

L'irritation constitue l'une des principales causes de l'altération des paramètres respiratoires durant l'exposition à des toxiques mais il en existe beaucoup d'autres. Celles-ci incluent d'autres types de réponses réflexes telles que la bronchoconstriction, les effets narcotiques de nombreux solvants ou simplement une diminution volontaire de la fréquence respiratoire causée par la nature désagréable de l'atmosphère inhalée. Ces réponses peuvent affecter le modèle respiratoire et donc la dose inhalée. Ceci peut être déterminé par des mesures réalisées au cours de l'exposition. De telles mesures sont incorporées de plus en plus fréquemment dans les tests de toxicité faits en routine afin de mesurer plus correctement la dose inhalée. A partir de ces paramètres, il est possible d'obtenir la quantité de l'atmosphère test inhalée par l'animal. Il est important de se rappeler que ces techniques ne nous fournissent pas la quantité de toxique inhalé qui est absorbée ou déposée dans le système respiratoire.

Nous allons maintenant étudier les méthodes utilisées pour produire et analyser l'atmosphère à laquelle les animaux seront exposés durant les essais de toxicité par inhalation.

4. GENERATION ET ANALYSE DE L'ATMOSPHERE

4.1. GENERATION DE L'ATMOSPHERE

Deux cas se présentent :

- Le produit est gazeux à la température ambiante ou sa tension de vapeur est élevée : il est alors relativement aisé d'obtenir une atmosphère composée d'une concentration homogène et constante du produit
- Le produit est solide ou liquide à la température ambiante : il est alors nécessaire de préparer des aérosols. De stabilité très variable, ils peuvent se déposer au niveau des parois de l'appareillage.

Ainsi, les systèmes de production de l'atmosphère se scindent en deux classes : ceux qui produisent des atmosphères non particulaires, comme des gaz ou des vapeurs, et ceux qui produisent les atmosphères particulaires, comme des aérosols de solides ou de liquides.

La production des atmosphères test contenant une concentration donnée d'agent toxique est réalisée par l'introduction d'une quantité connue d'agent toxique à tester dans un volume d'air constant durant une période donnée.

Il est important de noter que les gaz et les vapeurs sont obtenus sans grande difficulté à la concentration cible. Par contre, les particules sont plus difficiles à contrôler; les concentrations obtenues peuvent varier énormément de la concentration cible recherchée. Dans tous les cas, un contrôle suffisant des systèmes de production des particules est nécessaire afin d'obtenir des atmosphères stables. Pour ce faire, des équipements spéciaux permettent la production et le contrôle des atmosphères dans les chambres d'inhalation (197).

4.1.1. Production des atmosphères non particulaires : gaz et vapeurs

Comme nous venons de le dire, les gaz et vapeurs constituent l'atmosphère la plus simple à générer. Ils peuvent être produits de différentes manières.

La production d'un gaz de grande pureté, comme par exemple le dioxyde de soufre ou d'azote et le dioxygène, est relativement simple. La dilution directe du gaz dans de l'air propre permet d'obtenir des concentrations appropriées pour l'exposition. Le gaz testé peut être mélangé à d'autres gaz avant d'être introduit directement dans la chambre d'exposition.

La vaporisation d'un liquide peut se réaliser soit par la chaleur soit en augmentant l'aire de surface du liquide. Pour les systèmes de production de vapeurs basés sur le principe de l'augmentation de l'aire de surface du liquide, la température (à l'intérieur des limites de stabilité chimique) et l'écoulement de l'air à travers la surface du liquide est un moyen d'augmenter l'efficacité.

En général, la méthode basée sur l'augmentation de l'aire de surface du liquide est réalisée soit par atomisation dans une chambre réservoir soit en passant le liquide sur des perles de verres chaudes ou des dispositifs similaires conçus pour accroître l'aire de surface du liquide (161).

La méthode la plus utilisée est l'atomisation du liquide à un taux constant. En effet, elle peut être réalisée pendant de longues durées et évite les problèmes rencontrés dans le cas où l'agent test contient des impuretés et est instable à l'aération continue. L'échantillon est introduit dans l'atomiseur grâce à une seringue connectée à une pompe. Cet appareil permet de pulvériser très finement le liquide. La taille de la seringue, la fréquence d'injection, le volume d'air traversant l'atomiseur, la densité et le poids moléculaire du composé déterminent la concentration réelle produite.

Une autre technique, dépendant des propriétés physiques telles que la viscosité et la pureté chimique, consiste à utiliser une seringue connectée à une pompe afin de placer le composé test liquide sur une surface chauffée. Les composés vaporisés obtenus sont ensuite transportés par l'azote ou l'air dans la chambre d'exposition.

Enfin, une autre méthode consiste à faire barboter de l'air dans du liquide chauffé : les composés liquides peuvent être vaporisés dans un barboteur en verre avant d'être transportés par l'air ou l'azote dans la chambre d'exposition.

L'avantage des méthodes de production basées sur l'atomisation d'un liquide ou sur le passage sur une surface chaude est qu'en général la volatilisation totale d'un mélange de substances volatiles peut être réalisée. On obtient de cette façon une atmosphère composée des constituants individuels dans les mêmes proportions que celles trouvées dans le mélange liquide d'origine.

Par contre, la production par barbotage peut conduire à une volatilisation différentielle si les composants du mélange ont des pressions de vapeur différentes. Ainsi, le composé le plus volatil se vaporisera en premier de façon prédominante suivi par les composés de plus faible volatilité. Ceci peut provoquer des variations de la concentration mais aussi de la composition de l'atmosphère test. De tels problèmes de volatilisation différentielle devraient être pris en considération lors de la production de vapeur à partir d'un liquide relativement pur contenant des traces d'impuretés moins volatiles mais toxiques. Dans ce cas, le composé le moins volatil se concentre à l'intérieur du container et peut par la suite être généré à d'importantes concentrations toxiques.

4.1.2. Production des atmosphères particulaires (237)

La génération des matériaux particulaires de manière uniforme est plus difficile à obtenir que la production des gaz ou des vapeurs (147, 188).

Lors des études par inhalation, l'aérosol doit être capable de pénétrer dans l'ensemble des régions de l'appareil respiratoire. Par conséquent, les systèmes de production des aérosols doivent être capables de concevoir des particules de taille convenable. En effet, la taille des particules détermine la région de l'appareil respiratoire où l'aérosol se dépose et donc influence la toxicité. Par conséquent, la capacité à contrôler la taille des particules contenues dans l'aérosol est primordial.

Malheureusement, la méthodologie pour parvenir à cette fin est imparfaite car de nombreux aérosols produits sont de type polydispersé. De plus, l'établissement d'une concentration connue et constante de particules dans une gamme de dimension étroite présente des difficultés techniques.

Différents types de générateurs d'aérosols sont disponibles. Les composés particuliers peuvent être produits à partir d'un liquide ou d'une poudre sèche :

4.1.2.1. Production des aérosols à partir des liquides

Il existe deux principaux procédés utilisés pour produire un aérosol sous des conditions contrôlées de laboratoire :

- Condensation à partir de vapeurs saturées ou
- Dispersion de solution ou de suspension par atomisation ou nébulisation.

Les aérosols liquides présentent des problèmes de production. Tout d'abord, s'ils sont extrêmement volatils, on peut aboutir au final à la production d'une vapeur. De plus, les liquides plus denses ou visqueux nécessitent une plus grande énergie pour surmonter la tension de surface et former ainsi des gouttelettes de la taille désirée.

Les générateurs utilisant le principe de condensation produisent seulement de faibles concentrations d'aérosols, mais peuvent être utilisés pour produire des aérosols de type monodispersé. Les aérosols issus de composés possédant une volatilité modérée à pression et température ambiantes peuvent être générés par ce procédé.

Cette technique implique dans un premier temps le chauffage des composés test. Puis, l'air va prendre en charge la phase vapeur créée par l'augmentation de la température. L'air passe ensuite à travers un tuyau où il est refroidi à température ambiante. Ceci produit une saturation de la phase vapeur puis une condensation.

Seuls les aérosols de composés purs devraient être générés de cette façon puisque l'élimination de la phase vapeur située au-dessus du composé chauffé peut causer une distillation fractionnée des mélanges de produits chimiques avec différentes pressions de vapeur.

Les atomiseurs et les nébuliseurs font appel à des méthodes d'atomisation liquide en utilisant de l'air comprimé comme force motrice.

Les atomiseurs sont des appareils très simples qui utilisent un jet d'air à grande vitesse pour interrompre le flux d'un liquide lorsqu'il quitte un orifice étroit. Il existe de nombreux concepts basés sur ce principe :

- L'*atomiseur de Schlick* est un exemple d'atomiseur disponible dans le commerce et pouvant être utilisé pour produire des atmosphères test (figure 23 A). Il est composé d'acier inoxydable et est donc convenable pour l'utilisation d'un grand nombre de liquides, dont les solvants organiques. Dans ce dispositif, le jet d'air forme une couronne autour du jet interne de liquide. Ceci évite l'évaporation des substances volatiles à l'intérieur de la gorge du jet, ce qui pourrait provoquer le blocage du jet par précipitation du soluté.

Les atomiseurs produisent un large spectre d'aérosols contenant une grande gamme de tailles de particules. Des systèmes permettent d'éliminer les particules grossières par l'action d'un cyclone : elles sont collectées en se heurtant sur la surface externe du cyclone tandis que les fines particules respirables restent dans le courant d'air qui est dirigé vers la chambre d'exposition.

Les nébuliseurs sont des appareils plus sophistiqués que les atomiseurs. La différence principale entre ces deux types de générateurs d'aérosols est que les nébuliseurs possèdent des systèmes qui sélectionnent la taille des particules. Il s'agit en général d'un déflecteur placé sur le trajet du mélange air-liquide.

- Le *nébuliseur de Wright* en est un exemple (figure 23 B). Il est fabriqué à partir de résine polyacrylique (262), mais ceci empêche l'utilisation de cet appareil avec des composés contenant beaucoup de solvants organiques.

Certains nébuliseurs, conçus pour assurer des thérapies, sont également utilisables en toxicologie par inhalation.

- D'autres types de nébuliseurs existent comme par exemple le *nébuliseur d'Acorn* qui est très compact et composé de résine polyacrylique (figure 23 C). Il n'est donc pas adapté, comme le modèle de Wright, aux composés contenant des solvants organiques.

Bien que la conception de ces systèmes datent de quelques décennies, ils sont toujours utilisés en pratique courante dans les essais toxicologiques.

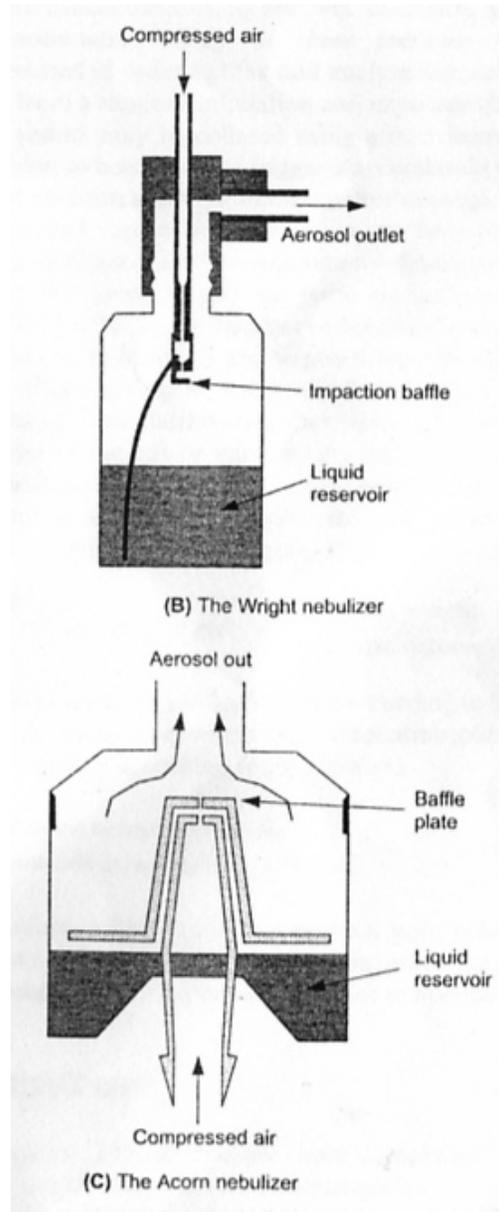
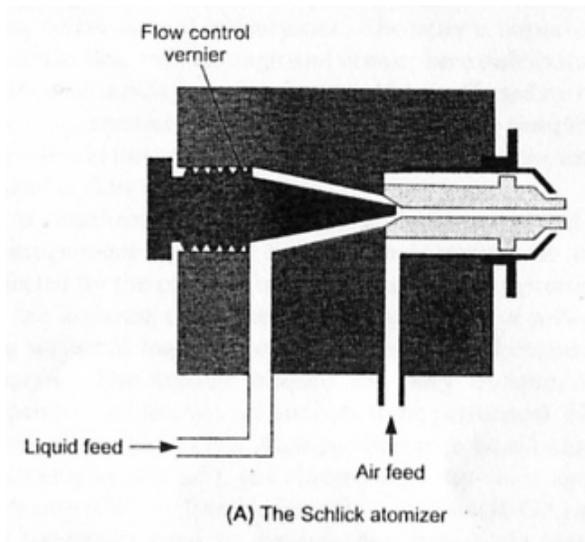


Figure 23 : Représentation schématique des systèmes de production des aérosols liquides les plus communément utilisés (112).

4.1.2.2. Production des aérosols à partir des solides

La génération des aérosols à partir de composés solides utilise en général des techniques de dispersion sèche. Ces dernières présentent des problèmes qui sont propres à chaque type de poussière étudié.

De façon générale, la poudre étudiée doit être dispersée sous forme de particules unitaires plutôt que d'agglomérats. Ceci nécessite un système qui place continuellement une poudre dans un générateur à un taux constant et un système de dispersion de cette poudre. La plupart des composés contiennent des particules de taille et de forme variées, ce qui signifie que des conditions monodispersées sont rarement rencontrées. De même, la distribution de la taille des particules diffère de la poudre d'origine.

La dispersion de la poudre et la destruction des agglomérats sont accomplies en fournissant une énergie suffisante pour combattre les forces d'attraction entre les particules. En général, un courant d'air à grande vitesse est appliqué à un volume relativement faible de poudre afin de séparer les particules.

Il est à noter que les composés hydrophobes tels que le talc sont plus facilement dispersés que les composés hydrophiles tels que le quartz. De même, les poudres sèches se dispersent plus aisément que celles qui sont humides.

Nous allons décrire deux dispositifs utilisés lors de la fabrication des aérosols solides :

- Les systèmes de production des poussières basés sur le mécanisme de Wright sont largement utilisés en pratique courante et sont disponibles dans un grand nombre de formes commerciales (figure 24 A).

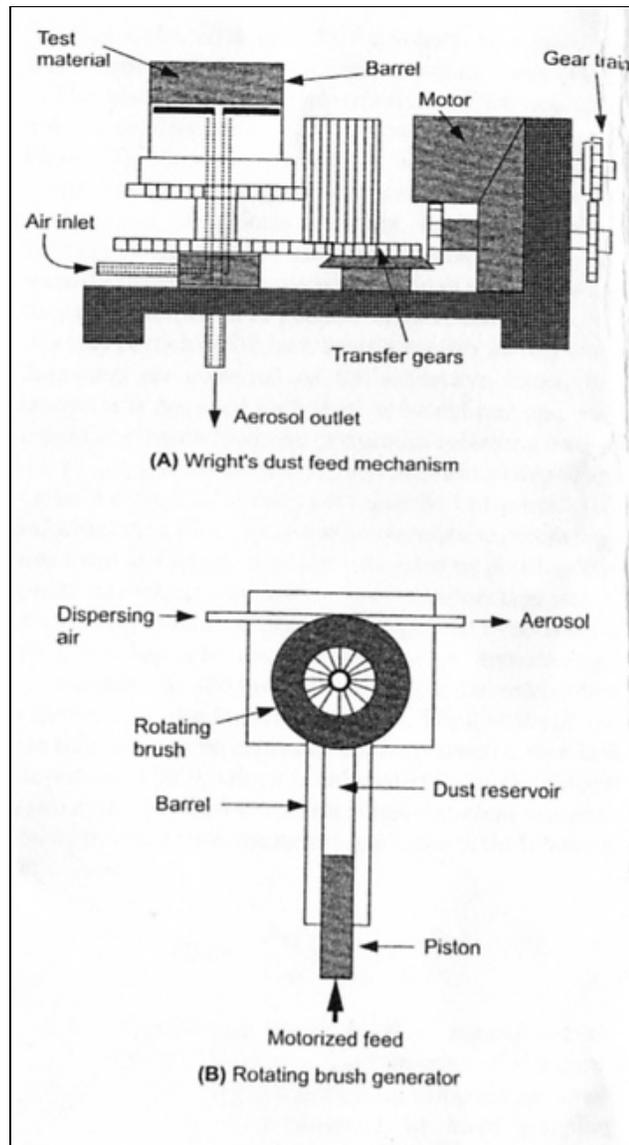
La poudre est tout d'abord comprimée sous forme d'agglomérat dur. Puis, un racleur vient au contact de cet agglomérat grâce à une série d'équipements propulsés par des moteurs à vitesse constante. Le dispositif permet ensuite une dispersion de la poudre grâce à l'introduction d'un courant d'air.

- Une approche alternative du système générateur de Wright est l'utilisation d'un générateur à brosse rotatoire pour disperser la poudre comprimée dans un cylindre (figure 24 B).

Un piston pousse la poudre comprimée contre une brosse rotatoire faite en plastique ou en acier inoxydable. Une variante de ce dispositif consiste en l'utilisation d'une arête tranchante en rotation continue à la place de la brosse. Un courant d'air de pression négative disperse ensuite les particules. Avant d'être introduit dans la chambre d'exposition, l'aérosol peut être passé à travers un cyclone qui retire les particules de taille supérieure à 30 µm et permet la séparation des agglomérats qui auraient pu se former.

Ce générateur est capable de contrôler finement la concentration atmosphérique et peut être utilisé pour produire des atmosphères composées de substances fibreuses.

Figure 24 : Représentation schématique des systèmes de production des aérosols solides les plus communément utilisés (112).



4.2. ANALYSE DE L'ATMOSPHERE

Durant les essais toxicologiques, l'atmosphère à laquelle les animaux sont exposés doit être mesurée et caractérisée. En effet, une fois que l'atmosphère a été générée, il est nécessaire de confirmer que cette dernière soit convenable d'un point de vue chimique et physique afin de fournir une estimation valide de la toxicité par inhalation de la substance test.

Tous les systèmes analytiques de suivi des concentrations atmosphériques comprennent deux étapes principales :

- La première étape implique la collecte d'un échantillon représentatif de l'atmosphère, en général situé au niveau de la zone où respire l'animal exposé. La technique d'échantillonnage doit être efficace, rapide, facilement automatisée et peu enclin aux erreurs.

- La seconde étape comprend l'analyse et la détermination de la nature physico-chimique de l'atmosphère.

4.2.1. Analyse des atmosphères non particulières

En ce qui concerne les gaz et les vapeurs, la première étape pose en général peu de problèmes. Par la suite, les techniques analytiques les plus communément utilisées pour la mesure des concentrations des gaz et vapeurs sont la spectroscopie infrarouge, la chromatographie gazeuse ou la chromatographie liquide haute pression.

Dans tous les cas, un calibrage fréquent des instruments analytiques est essentiel. La plupart de ces méthodes peuvent être automatisés. Les résultats sont ensuite collationnés grâce à un micro-ordinateur et des alarmes peuvent se déclencher si les concentrations sont en dehors d'un intervalle donné.

4.2.2. Analyse des atmosphères particulières(143)

Les atmosphères particulières sont plus complexes à analyser que les atmosphères gazeuses.

La collecte des échantillons peut être obtenue par différentes méthodes incluant les surfaces de sédimentation, les filtres de membrane, les impacteurs en cascade, les précipitateurs thermique ou électrostatique, les centrifugeuses et les épurateurs. Ces techniques ne seront pas détaillées dans cette thèse.

Les difficultés rencontrées lors de l'échantillonnage sont expliquées par Vincent (241). Dans cette étape, il est important de ne pas altérer la concentration (par dépôt sur les parois du système d'échantillonnage) ou la taille aérodynamique (par évaporation ou condensation) des gouttelettes présentes dans l'échantillon.

Deux aspects fondamentaux d'un aérosol doivent être mesurés : la distribution de la taille aérodynamique et la concentration massique.

- Les *filtres* sont la méthode la plus utilisée pour la détermination de la concentration massique de l'aérosol (figure 25 B). Elle est mesurée par extraction, à un débit connu, d'un volume donné de l'atmosphère test à travers un filtre. La masse du filtre est pesée avant et après l'échantillonnage afin de fournir une estimation gravimétrique de la masse collectée. Le filtre peut aussi être analysé chimiquement afin d'obtenir une description plus détaillée de la nature chimique de l'aérosol.

La concentration atmosphérique de la particule est calculée simplement à partir de la masse collectée divisée par le volume de l'air présent dans l'échantillon. Elle est exprimée en général en mg/m^3 ou en mg/L .

- La détermination de la distribution de la taille aérodynamique d'un aérosol est déterminée le plus souvent grâce à un *impacteur en cascade* (figure 25 B). Ce dispositif utilise les propriétés inertielles des particules pour leur collecte. Un tel équipement assure une séparation progressive des particules au fur et à mesure que l'aérosol progresse le long de l'unité (118).

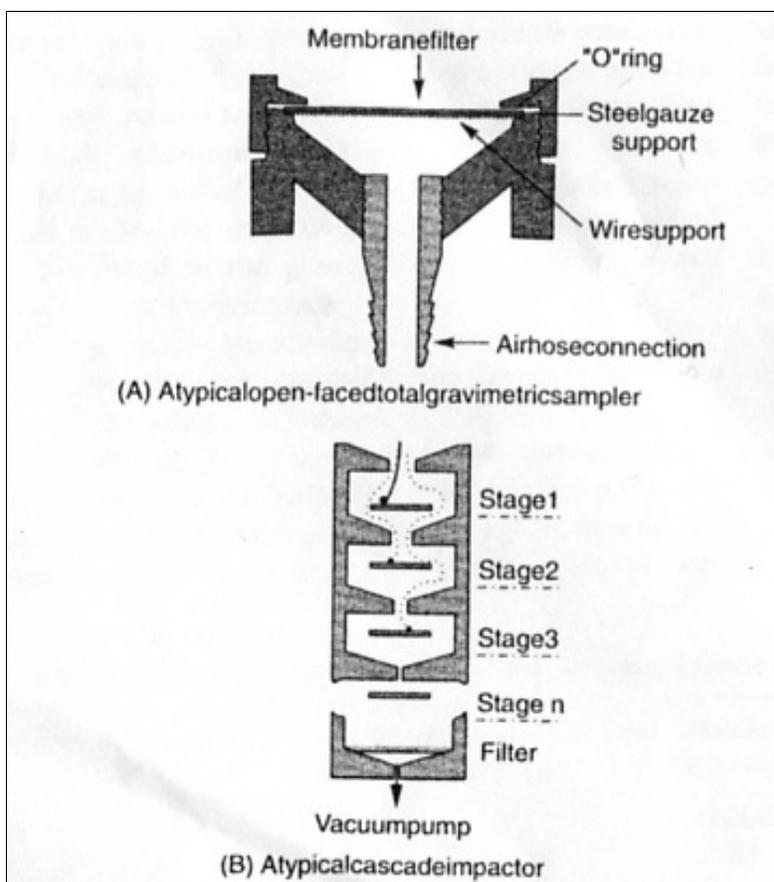


Figure 25 : (A) : Schéma du filtre utilisé pour la collecte des particules contenues dans un aérosol. (B) : Impacteur en cascade utilisé pour déterminer la distribution de la taille particulaire d'un aérosol (112).

5. INSTALLATIONS EXPERIMENTALES ET TYPES D'EXPOSITION

(47, 70, 71, 132, 140, 183, 185, 186, 204)

Le but principal des études par inhalation est d'exposer des animaux à des atmosphères appropriées pendant une période donnée.

Lors des expositions par inhalation chez l'animal, des installations appropriées, des techniques et des équipements spéciaux sont nécessaires pour mettre en évidence les effets des toxiques administrés par inhalation et pour reproduire au mieux ce qui se passe chez l'homme.

Chez le chien, les systèmes d'exposition utilisés au cours des essais toxicologiques se divisent en trois grandes catégories :

- L'exposition du corps entier dans une enceinte confinée,
- L'exposition de la tête entière ou du nez par la mise en place de masques.

De plus, des méthodes alternatives ont été mises en place afin d'étudier les effets des toxiques suite à une exposition complète ou partielle des poumons. Sachsse (208) et Phalen (184, 188) ont discuté des avantages et des inconvénients de ces différentes approches.

| Méthodes utilisées | Types d'exposition |
|---------------------------|---|
| Méthodes "classiques" | Exposition du corps entier Exposition limitée au nez Exposition limitée à la tête |
| Méthodes alternatives | Intubation endo-trachéale Cathéter dans les conduits aérifères Instillation intra-trachéale Insufflation |

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents types d'exposition utilisés chez le chien.

5.1. EXPOSITION DU CORPS ENTIER : ENCEINTE CONFINÉE (Tableau 4, ligne A)

5.1.1. Conception des chambres d'inhalation (67, 70, 86, 108, 115, 218)

Les chambres d'inhalation doivent contenir un accès pour placer et sortir les animaux test, pour prélever des échantillons et pour introduire et retirer les agents chimiques. Pour ce faire, l'enceinte fermée est connectée à des entrées et des sorties d'air. Le toxique est introduit sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol grâce à une arrivée d'air. Un filtre placé à la sortie permet d'adsorber le toxique, évitant ainsi sa libération dans l'atmosphère. Des fenêtres ou des hublots doivent permettre une bonne visibilité pour l'observation de l'animal.

Les chambres d'exposition doivent être conçues afin d'assurer une distribution uniforme et homogène du toxique dans le courant atmosphérique, tout en évitant des phénomènes de turbulence qui pourraient entraîner des variations locales de concentrations. De plus, les chambres doivent permettre d'atteindre rapidement les concentrations désirées en toxique, de maintenir de façon homogène les niveaux souhaités dans l'ensemble de la chambre et de minimiser la hausse de température et l'accumulation des produits non désirés associées à l'occupation animale (en général, l'ammoniac et le dioxyde de carbone).

Les chambres doivent donc posséder un modèle d'écoulement de l'air qui facilite le mélange et assure l'homogénéité de l'atmosphère dans la chambre tout en évitant une augmentation des polluants indésirables.

Un problème majeur concernant l'exposition à des aérosols acides est l'augmentation possible de la quantité d'ammoniac dans les chambres en raison de l'action microbienne sur les excréments animaux. Ainsi, un système sanitaire performant doit aussi accompagner l'usage des chambres.

Les chambres d'exposition nasale évitent nombres de ces problèmes.

Selon MacFarland (150) et Bernstein (21), le volume de l'enceinte doit être au minimum égale à 20 fois le volume de l'animal afin d'éviter une diminution de la concentration du toxique et une augmentation de la température intérieure. Le volume de la chambre doit permettre à l'animal d'être placé en position centrale de telle façon qu'il soit exposé à une concentration constante en toxique.

A la base, les chambres ont été fabriquées à l'aide de différents matériaux : murs en verre avec des cadres en bois (121) ou en tôle (261). Or, les matériaux de construction constituant les parois doivent être résistants à la corrosion, peu absorbants et être facilement nettoyés et décontaminés. De même, il est primordial que ces matériaux ne réagissent pas chimiquement avec le toxique à tester. L'acier inoxydable, le téflon et le verre possèdent ces avantages. De nos jours, les chambres sont donc fabriquées à partir de ces matériaux inertes. Il est à noter que du polyéthylène ou du tétrafluoroéthylène peuvent être pulvérisés sur les murs afin de produire une surface non réactive.

5.1.2. Systèmes d'exposition statiques ou dynamiques

Les systèmes d'exposition peuvent se mener selon un mode dynamique ou statique :

5.1.2.1. Systèmes statiques

Dans une chambre statique, il n'y a pas d'écoulement d'air à travers le système. Les chiens pénètrent dans un système fermé hermétiquement qui contient une atmosphère contenant le toxique étudié. Par conséquent, ces systèmes reposent généralement sur l'air présent à l'intérieur de la chambre pour maintenir les animaux exposés. Le temps d'exposition est relativement court, bien que certains systèmes soient conçus pour remplacer l'oxygène consommé et éliminer le dioxyde de carbone expiré afin d'augmenter le temps d'exposition.

Les systèmes statiques conviennent donc seulement pour l'estimation du risque d'une exposition à très court terme. La concentration atmosphérique ne reste généralement pas stable dans ces systèmes. En effet, si l'atmosphère est produite uniquement au début de l'expérience, les concentrations en toxiques diminueront en raison des phénomènes d'absorption par l'animal.

L'avantage des systèmes statiques est leur simplicité d'emploi. De plus, ce type de système consomme seulement la fraction de toxique requise pour générer une atmosphère dynamique aux concentrations équivalentes. Ainsi, les systèmes statiques sont utilisés de préférence en recherche lorsque le toxique testé est marqué par un isotope.

5.1.2.2. Systèmes dynamiques

La plupart des essais par inhalation utilisent des conditions dynamiques d'exposition. Les animaux sont placés dans des chambres d'exposition et le système de production est mis en service. Dans les systèmes dynamiques, l'atmosphère test passe à travers la chambre d'exposition et est renouvelée continuellement. Ceci permet de maintenir une atmosphère stable et d'éviter une diminution de la concentration en oxygène causée par la respiration de l'animal.

Les systèmes dynamiques, quelle soit leur taille ou leur concept, impliquent une quantité considérable d'équipements annexes afin de maintenir la température et l'humidité relative et des conditions appropriées à l'écoulement de l'air dans la chambre.

Il existe un grand nombre de modèles utilisés en pratique courante, certains étant disponibles dans le commerce, d'autres étant conçus et construits par des laboratoires privés.

Les principaux critères à prendre en compte lors de la conception des systèmes dynamiques sont les suivants :

- La concentration de l'atmosphère test doit être raisonnablement uniforme dans l'ensemble de la chambre et doit augmenter et diminuer à un taux proche de la théorie respectivement au début et à la fin de l'exposition (figure 26). Tout d'abord, la concentration dans la chambre augmente rapidement jusqu'à un équilibre théorique. Silver démontra que le temps nécessaire pour atteindre un pourcentage donné de la concentration d'équilibre dans la chambre était proportionnel au débit de l'atmosphère pénétrant dans la chambre et au volume de la chambre d'exposition (226) :

$$t_x = kV/F$$

où : t_x correspond au temps requis pour atteindre $x\%$ de la concentration d'équilibre
 k est une constante dont la valeur dépend de celle de x
 V est le volume de la chambre
 F est le débit total à l'intérieur de la chambre.

La valeur t_{99} est fréquemment utilisée car elle représente le temps requis pour atteindre 99% de la concentration d'équilibre et elle informe sur l'efficacité de la chambre. Ainsi, la valeur théorique de k à t_{99} est de 4,605 si l'efficacité est maximale. A ce niveau, la concentration dans la chambre peut être considérée comme constante.

Lors de l'évaluation de la performance de la chambre, plus k se rapproche de la valeur de 4,605, meilleure est l'efficacité de la chambre.

Les caractéristiques temps-concentration d'une chambre donnée sont décrites par les valeurs de V et F (149, 226).

On peut noter que les concentrations réelles mesurées à partir des échantillons collectés dans la chambre présentent des variations durant une seule exposition ou entre les différents jours d'une exposition de longue durée. De façon générale, la concentration des gaz ou des vapeurs présente moins de variation à l'intérieur de la chambre que dans le cas des aérosols. En effet, après plusieurs semaines d'expérimentation, l'écart-type d'une série de mesures réalisées au cours d'une journée ou durant plusieurs jours consécutifs ne varie pas plus de 10% dans le cas des gaz ou des vapeurs. Par contre, des variations de l'ordre de 20% sont fréquemment rencontrées avec les aérosols, notamment avec les aérosols solides (150).

- Le débit d'air doit être contrôlé car il ne doit pas être trop élevé car ceci pourrait provoquer des courants d'air. Le débit doit permettre de maintenir une quantité adéquate d'oxygène et des niveaux convenables de température et d'humidité. L'exposition se termine lorsque le débit de l'agent est arrêté ce qui mène au déclin de sa concentration dans la chambre selon une courbe exponentielle (figure 26).

- Les matériaux de la chambre ne doivent pas modifier la nature physique ou chimique de l'atmosphère test.

Au cours d'une expérimentation, il est utile et recommandé de monitorer et de répertorier le débit d'air, la température et l'humidité à l'intérieur de la chambre. Le contrôle de la température à l'intérieur de la chambre est crucial pour réaliser une bonne conduite des études par inhalation. En effet, une température élevée peut altérer la physiologie et le métabolisme de l'animal et augmenter les interactions chimiques.

- Les chambres possèdent une pression atmosphérique égale à - 2 cm H₂O afin de protéger le personnel d'éventuelles fuites. La pression doit être vérifiée constamment dans le système.

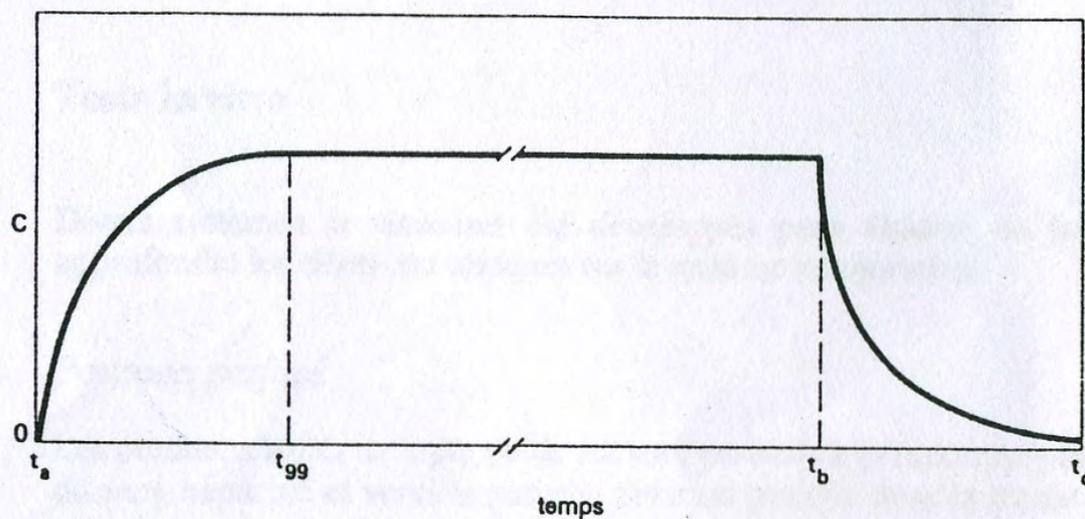


Figure 26 : Augmentation et diminution de la concentration dans un système fermé. L'exposition débute au temps t_a et s'arrête au temps t_c mais l'arrivée de toxique est stoppée au temps t_b ; la période d'exposition s'étend de t_a à t_c , l'exposition supplémentaire de t_b à t_c est prévue pour compenser la croissance exponentielle du toxique de t_a à t_{99} (148).

5.1.3. Inconvénients de l'exposition du corps entier

Dans ce type d'exposition, l'absorption des agents chimiques se fait par pénétration dans le système respiratoire, mais aussi par la peau et par passage dans le système gastro-intestinal suite à la déglutition. Une toxicité systémique peut alors être observée. En effet, les gaz, les vapeurs, les gouttelettes et les particules solides peuvent se dissoudre dans le fluide de mucus recouvrant le système respiratoire et atteindre, grâce à l'escalator muco-ciliaire, le pharynx où ils sont déglutis. Par ce mécanisme, ils atteignent le tractus digestif.

La toilette des chiens par léchage durant et après les expositions par inhalation peut aussi provoquer l'exposition du système gastro-intestinal. Or, les quantités déposées sur le pelage et par la suite ingérées par léchage peuvent être largement supérieure à celles déposées dans le système respiratoire.

Les aspects quantitatifs des expositions dermiques et orales n'ont pas été suffisamment étudiés mais peuvent varier de façon importante en fonction des propriétés physico-chimiques du toxique étudié.

5.2. SYSTEMES D'EXPOSITION LIMITES AU NEZ OU A LA TETE (Tableau 4, ligne B et C)

Les expositions limitées à la tête ou au nez sont utiles pour des expositions brèves et répétées. Elles permettent de limiter la voie d'entrée du toxique au système respiratoire. Il est impossible pour un animal d'éviter l'exposition par inhalation par cette méthode.

Les masques permettent une exposition uniquement du nez et sont limités aux animaux de grande taille. Ils ont été utilisés avec succès chez les chiens à partir de la fin des années 60 (14, 72, 235).

Ces systèmes possèdent de nombreux avantages. Tout d'abord, ils évitent l'absorption du toxique déposé sur le pelage du chien, soit directement par passage transcutané, soit indirectement par ingestion suite au léchage de l'animal. De plus, ils nécessitent une quantité plus faible de toxique à tester. Enfin, il est possible de réaliser des mesures physiologiques pendant l'exposition.

Les inconvénients des systèmes d'exposition où seule la tête est placée dans la chambre d'exposition incluent la perte de substances sur le pelage de la tête, les difficultés à obtenir un joint adéquat au niveau du cou sans affaiblir la circulation. Comme dans le cas de l'utilisation des masques, les chiens devront être contenus, leur manipulation et l'ajustement de l'appareillage sur leur tête ou leurs narines demande du temps et un certain entraînement. De ce fait, il est possible d'induire un stress chez l'animal. De plus, seul un nombre limité de chiens peuvent être testés simultanément. Un autre inconvénient est que l'exposition ne reflète pas les cas humains et qu'il existe peu de systèmes d'exposition standardisés.

5.3. METHODES ALTERNATIVES

L'intubation endotrachéale, la trachéostomie et les cathéters dans les conduits aérifères peuvent être utilisés pour contourner le système respiratoire supérieur et exposer seulement les poumons aux gaz et aérosols.

- Les tubes endotrachéaux sont constitués de caoutchouc flexible. Ils passent par la bouche puis la trachée et sont rendus imperméables par gonflement d'un ballonnet placé à l'extrémité du tube. Un important contrôle de la dose délivrée est ainsi obtenu, ce qui s'avère utile lors de l'étude de substances extrêmement toxiques ou onéreuses.

Cette méthode comprend cependant de nombreux inconvénients. En effet, les mécanismes de défense naturelle du système respiratoire supérieur sont contournés. De plus, l'extrapolation des données recueillies sur l'animal à l'homme ne sont pas évidentes car les conditions expérimentales ne sont pas physiologiques (Tableau 4, ligne D).

Un exemple de l'usage de tubes endotrachéaux chez les chiens est l'étude de la toxicité de la fumée de cigarette (13).

- La trachéostomie possède en général les mêmes applications, avantages et inconvénients que la méthode précédente (Tableau 4, ligne D).

- Les cathéters dans les conduits aérifères permettent une pénétration profonde à l'intérieur des poumons et peuvent être utilisés pour délivrer des doses très précises dans des sites spécifiques de l'appareil respiratoire (19). Par exemple, seule une partie distincte des poumons peut être exposée au toxique (Tableau 4, ligne E).

- L'instillation intra-trachéale de toxiques est une méthode alternative à l'exposition des animaux par inhalation largement utilisée.

Les avantages de ce type d'exposition est le besoin de très faibles quantités d'agents test; les chambres d'exposition ne sont pas nécessaires et le support technique complexe utilisé pour la production et le maintien des conditions expérimentales d'exposition sont évitées. Grâce à ces qualités, le coût de ce type d'étude est relativement faible. De plus, une dose importante peut être délivrée, de façon très précise, directement au niveau des tissus respiratoires.

Cependant, la distribution de la dose au niveau des tissus de l'appareil respiratoire n'est pas uniforme et ne simule pas de façon correcte la distribution pulmonaire de l'agent chimique suite aux expositions par inhalation (26). En effet, l'instillation intra-trachéale provoque un dépôt moins uniforme et favorise les portions inférieures des poumons en raison de la sédimentation du composé.

Par conséquent cette méthode ne reflète pas exactement la réponse observée lors d'une inhalation (Tableau 4, ligne D).

En conclusion sur cette partie, le tableau 4 de la page suivante présente les différents types d'exposition que nous venons de passer en revue et récapitule pour chacune d'elles leurs propres avantages et inconvénients.

| Type d'exposition | Avantages | Inconvénients |
|-------------------------------|--|--|
| Corps entier (A) | <p>Etudes chroniques possibles</p> <p>Nombreuses bases de données historiques</p> <p>Environnement contrôlable</p> <p>Stress minimal</p> <p>Main d'œuvre minimale</p> | <p>Complicé</p> <p>Multiplés voies d'exposition : cutanée, oculaire et orale</p> <p>Variabilité de la "dose"</p> <p>Contact faible entre les animaux et le chercheur</p> <p>Onéreux</p> <p>Difficulté de contrôler les animaux durant l'exposition</p> |
| Tête seule (B) | <p>Adapté aux expositions répétées</p> <p>Voies d'entrée limitée</p> <p>Contrôle plus efficace de la dose reçue</p> | <p>Stressant pour les animaux</p> <p>Sceau étanche autour du cou</p> |
| Nez/bouche seul(e) (C) | <p>Exposition limitée à la bouche ou au système respiratoire</p> <p>Utilisation de moins de toxique</p> | <p>Stressant pour les animaux</p> <p>Sceau étanche autour de la face</p> |
| Poumons seuls (D) | <p>Précision de la dose</p> <p>Une voie d'exposition</p> <p>Utilisation de moins de toxique</p> | <p>Difficile techniquement</p> <p>Anesthésie ou trachéostomie</p> <p>Le nez est contourné</p> <p>Artéfacts concernant le dépôt et la réponse</p> |
| Poumon partiel (E) | <p>Précision de la dose totale</p> <p>Localisation de la dose</p> <p>Possibilité d'obtenir des doses locales très élevées</p> <p>Présence de tissu de contrôle non exposé sur le même animal</p> | <p>Difficile techniquement</p> <p>Anesthésie</p> <p>Difficulté de l'interprétation des résultats</p> <p>Redistribution possible du toxique à l'intérieur des poumons</p> |

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients des différents types d'exposition possibles lors des essais de toxicité par inhalation chez le chien.

TROISIEME PARTIE :

ESSAIS TOXICOLOGIQUES ET CONSEQUENCES

Cette troisième partie aborde les différents types d'essais toxicologiques réalisés en expérimentation et les conséquences biologiques observées dans l'espèce canine suite à ces essais. De plus, nous montrerons comment les toxicologistes aboutissent à une estimation du risque pour l'homme à partir des données recueillies lors de ces essais toxicologiques.

1. DETERMINATION DE LA TOXICITE AIGUE, A DOSES REPETEES (ETUDE SUR 14 OU 28 JOURS), SUBCHRONIQUE (ETUDE SUR 90 JOURS) ET CHRONIQUE PAR INHALATION (88)

Ce paragraphe a été rédigé à partir des données fournies dans les lignes directrices pour les essais de produits chimiques 403, 412 et 413 de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique). Ces lignes directrices ont été adoptées le 12 mai 1981. A ce jour, aucune actualisation de ces données n'a été apportée depuis leur adoption.

1.1. CONNAISSANCES REQUISES

La toxicologie par inhalation est la branche de la toxicologie la plus délicate et la moins codifiée.

Préalablement à la mise en place d'une étude de toxicité par inhalation, il est nécessaire de posséder un certain nombre de connaissances requises:

- Nature de la substance à tester : gaz, produit volatil, aérosol, substance particulaire...
- Identification chimique de la substance à tester
- Degré de pureté (impuretés) de la substance à tester
- Pour les liquides : pression de vapeur, point d'ébullition
- Pour les aérosols/substance particulaire : répartition des particules en taille, forme et densité
- Explosivité

Les études de toxicité par inhalation peuvent être aiguës, subchroniques ou chroniques en fonction de la durée d'exposition et de l'importance des examens cliniques et pathologiques pouvant s'avérer utiles.

1.2. DEFINITIONS

La détermination de la toxicité aiguë par inhalation constitue l'étape initiale de l'estimation et de l'évaluation des propriétés et du potentiel toxiques d'un gaz, de substances volatiles, d'un aérosol ou de particules (87).

La toxicité aiguë par inhalation est l'ensemble des effets néfastes provoqués par une substance susceptible d'être inhalée, après une exposition ininterrompue par inhalation sur une période de courte durée. Sa détermination apporte donc des informations concernant les effets toxiques d'une substance et les risques pour la santé liée à une exposition par inhalation à court terme.

Les études aiguës définissent à la fois la quantité d'agent chimique nécessaire pour produire une réponse donnée (le plus souvent la mort) et les signes et symptômes associés à une forte d'exposition; les concentrations sont en général relativement élevées. La plupart du temps, les effets aigus se produisent rapidement lors d'exposition à court terme.

Les résultats obtenus lors d'une étude de toxicité aiguë peuvent servir de base à la classification et à l'étiquetage. De plus, ils sont utilisés comme point de départ de l'établissement d'un programme d'administration de doses et de la détermination des niveaux de dose pour les essais à long terme.

La détermination de la toxicité à doses répétées ou de la toxicité subchronique est réalisée après obtention des renseignements initiaux concernant la toxicité aiguë de la dite substance. Elle fournit des informations sur les risques potentiels pour la santé, résultant d'expositions quotidiennes répétées, par inhalation, sur une période de temps limitée. Les risques liés aux substances susceptibles d'être inhalées dépendent de la toxicité propre de ces substances ainsi que de facteurs physiques tels que la volatilité et la taille des particules. Ces deux types d'études ont des objectifs communs :

- Elles permettent de détecter les effets indésirables survenant au bout d'un certain temps d'exposition causés par l'action cumulative du produit ou par d'autres mécanismes.
- Elles fournissent des précisions concernant la nature et la réversibilité des effets toxiques induits par l'inhalation du produit et la détermination de la nature de l'organe cible.
- Elles aident le scientifique à mettre en évidence une "dose sans effet", qui se définit comme une dose qui ne provoque aucun effet d'aucun type (clinique, biochimique, hématologique et nécropsique) pendant toute la période d'administration du produit.

La détermination de la toxicité chronique par inhalation implique des expositions répétées ou permanentes et est en général conduite à de faibles concentrations et pendant une longue période de temps (49).

Les études chroniques ont les mêmes buts que ceux expliqués précédemment dans le cas de la de la toxicité subchronique mais elles permettent également de mettre à jour un éventuel potentiel cancérigène. Enfin, elles simulent les conditions rencontrées dans l'environnement ou sur les lieux de travail.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE

Plusieurs groupes de chiens sont exposés durant une période fixée, à la substance testée, à différentes concentrations, à raison d'une concentration par groupe. Pour déterminer la toxicité aiguë, on réalise le plus souvent une exposition unique de 4 heures.

Concernant la toxicité à doses répétées, les animaux sont exposés quotidiennement et ce, pendant une durée de 14 ou de 28 jours. Cette durée est de 90 jours pour les études subchroniques et de 6 mois à 1 an pour les études chroniques.

Dans certains cas, un véhicule approprié est ajouté à la substance à tester afin d'obtenir plus aisément une concentration adaptée de cette substance dans l'atmosphère. Un groupe témoin est alors exposé à ce véhicule et il est nécessaire de démontrer qu'il n'entraîne aucune toxicité.

Puis, les chiens sont observés durant une période donnée. Les divers effets constatés ainsi que les taux de mortalités sont répertoriés.

Les animaux sont observés journallement lors des études à doses répétées, subchroniques ou chroniques afin de détecter toute manifestation éventuelle de toxicité.

Les animaux décédés durant l'expérience ainsi que certains animaux ayant survécus sont autopsiés.

1.4. MODE OPERATOIRE

1.4.1. Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température de la chambre doit être maintenue à environ 22°C (+/- 3°C) par des systèmes de réfrigération et posséder un taux d'humidité relative compris entre 30 et 70%. Quand l'éclairage est artificiel, des périodes de 12 heures de clarté et d'obscurité alternent.

Lors d'exposition subchronique ou chronique, une source adéquate d'eau et de nourriture doit être disponible, ce qui n'est pas toujours le cas dans les études aiguës.

1.4.2. Equipement

L'équipement respiratoire utilisé doit assurer un flux d'air dynamique pourvu d'un système d'analyse des concentrations appropriées, une teneur appropriée en oxygène de 19% et une atmosphère d'exposition uniformément répartie.

Le débit d'air doit être réglé de manière à assurer des conditions identiques à travers tout le dispositif.

Dans le but de protéger le personnel, la pression à l'intérieur de la chambre est légèrement négative afin d'éviter la fuite de la substance à tester dans l'espace environnant.

Dans le cas où il est souhaitable d'éviter une exposition simultanée par voies orale et cutanée, d'autres méthodes sont utilisables : systèmes d'exposition oro-nasal ou de la tête seule que nous avons exposés précédemment.

1.4.3. Conditions expérimentales

1.4.3.1. Concentration d'exposition

Un essai préliminaire est réalisé afin d'établir des concentrations d'exposition appropriées. Il y a lieu d'utiliser au moins trois concentrations différentes de la substance à tester suffisamment espacées ainsi qu'un groupe témoin et, dans le cas échéant, un groupe témoin du véhicule (dont la concentration correspondra au niveau d'exposition le plus élevé). Exception faite de l'exposition à la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités d'une manière identique à ceux des groupes d'essai.

Si la substance à tester est potentiellement explosive, les concentrations susceptibles de provoquer une détonation sont évitées.

Dans le cas des études de toxicité aiguë, les concentrations choisies doivent faire apparaître dans les groupes d'essai une série d'effets toxiques et de taux de mortalité. A partir de ces données, il est possible d'obtenir une courbe concentration-mortalité et de déterminer la CL 50 (concentration létale moyenne). Celle-ci est une valeur statistique de la concentration d'une substance dont l'exposition par inhalation durant une période donnée entraîne la mort de 50% des animaux durant l'exposition ou au cours d'une période donnée après l'exposition. La valeur de la CL 50 s'exprime en poids de substance à tester par volume d'air (mg/L) ou en parties par million (ppm).

Dans le cas des études de toxicité sur 14, 28 ou 90 jours, la concentration la plus élevée doit produire des effets toxiques sans toutefois atteindre un taux de mortalité qui empêcherait une évaluation valable de l'essai.

Concernant la concentration la plus faible, elle ne doit produire aucune manifestation de toxicité. Lorsqu'il existe une estimation utilisable de la concentration d'exposition chez l'homme, la concentration la plus faible doit être supérieure à celle-ci.

Idéalement, la concentration intermédiaire doit produire le plus faible niveau d'effets toxiques qu'il soit possible de discerner.

Dans le cas où l'on a recours à plusieurs concentrations intermédiaires, leurs niveaux doivent être échelonnés de façon à produire une gradation dans les effets toxiques observés.

Dans les groupes de concentrations faible et intermédiaire ainsi que dans les groupes témoins, le taux de mortalité doit être faible afin de permettre une évaluation valable des résultats.

1.4.3.2. Durée d'exposition

Après égalisation des concentrations dans la chambre, la durée d'exposition est d'au minimum 4 heures pour les essais de toxicité aiguë. Pour les études de toxicité sur 14, 28 ou 90 jours, cette durée est de 6 heures par jour, à raison de 5 à 7 jours par semaine.

Lors d'exigences particulières, il peut être nécessaire de tester différentes durées d'exposition.

1.4.3.3. Période d'observation

La durée d'observation varie selon le type d'étude considérée.

La période d'observation permet de déterminer le caractère réversible, la persistance ou l'apparition différée d'effets toxiques. Elle doit être d'au moins 14 jours pour les études de toxicité aiguë et à doses répétées de 14 ou 28 jours. Cette période est d'au moins 28 jours pour les études de toxicité subchronique de 90 jours.

Cependant, la durée d'observation ne doit pas être fixée de façon rigide. En effet, elle est modulée en fonction des effets toxiques observés, de leur vitesse d'apparition et de la longueur de la période de récupération.

Des observations complémentaires sont réalisées quotidiennement et s'accompagnent de mesures appropriées visant à réduire *a minima* le nombre d'animaux perdus pour l'étude.

1.4.4. Mesures des propriétés physiques

Au cours de l'expérimentation, il y a lieu de mesurer ou de contrôler les paramètres suivants :

- Le débit d'air (il doit être contrôlé en continu)
- La concentration réelle de la substance à tester durant toute l'exposition; celle-ci doit être maintenue aussi constante que possible.
- La granulométrie des particules afin de déterminer la stabilité des concentrations d'aérosols. Au cours de l'exposition, des analyses doivent être effectuées aussi souvent que l'exige le contrôle de l'uniformité de la répartition de la taille des particules.
- La température et l'humidité doivent être contrôlées en continu.

1.4.5. Examens cliniques

Chaque animal possède un dossier dans lequel sont notées et enregistrées les observations pendant et après l'exposition.

Un examen clinique attentif doit être pratiqué au minimum une fois par jour. Au cours de cet examen, toutes les manifestations de toxicité, y compris le moment de leur apparition, le degré et la durée de ces manifestations sont enregistrées.

Les observations notées au cours de l'essai correspondent aux changements constatés au niveau du pelage et de la peau, des yeux et des muqueuses, des systèmes respiratoire et circulatoire, des systèmes nerveux central et autonome, de l'activité somatomotrice et des manifestations comportementales. Il y a lieu également de mesurer la quantité de nourriture consommée.

De plus, une attention particulière est accordée aux tremblements, aux convulsions, à la salivation, à la diarrhée, à la léthargie, ainsi qu'au sommeil et au coma.

Si l'animal décède, le moment de la mort est notée avec précision. Chaque animal est pesé chaque semaine après l'exposition. Les changements de poids sont calculés et enregistrés.

Les examens complémentaires suivants doivent être effectués :

- Un examen hématologique complet doit être réalisé. Il comprend une numération-formule sanguine et les mesures de l'hématocrite, de l'hémoglobémie et des temps de coagulation.

- La détermination de la biochimie clinique du sang doit être accomplie au terme de l'étude. Les mesures sont fonction des observations relatives au mode d'action de la substance. D'autres déterminations peuvent s'avérer nécessaires. Elles correspondent à des analyses de lipides, d'hormones, de l'équilibre acido-basique, de la méthémoglobine... Si nécessaire, une biochimie clinique complémentaire peut être utilisée dans le but d'approfondir l'étude des effets toxiques observés.

- Une analyse urinaire est quelquefois nécessaire si la toxicité probable ou observée en indique le besoin.

1.4.6. Anatomo-pathologie

1.4.6.1. Autopsie générale

Une autopsie générale des animaux est réalisée systématiquement. Lorsque des signes importants de toxicité indiquent la mise en cause possible d'autres organes, ceux-ci doivent être examinés et tous les changements pathologiques macroscopiques enregistrés.

L'autopsie générale est identique à celle réalisée lors des autres essais de toxicité (faisant appel à d'autres voies d'administration).

Elle comprend l'examen de la surface externe du corps, de tous les orifices, des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Le foie, les reins, la rate, les capsules surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide, aussitôt que possible après dissection, pour éviter leur dessiccation. Les organes et les tissus précédents doivent être conservés dans un milieu approprié au cas où un examen histopathologique s'avérerait nécessaire. Les poumons doivent être prélevés sans la moindre détérioration. Ils doivent être pesés et traités à l'aide d'un fixateur approprié de façon à garantir la conservation de la structure pulmonaire (on considère généralement que la perfusion à l'aide d'un fixateur s'avère être une méthode efficace). Le foie, les reins, la rate, les capsules surrénales et le cœur ainsi que tout organe laissant apparaître des lésions macroscopiques ou des changements de taille doivent être examinés minutieusement.

1.4.6.2. Histopathologie

Un examen histopathologique complet doit être effectué sur le tractus respiratoire et sur les organes et les tissus de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe exposé au niveau de dose le plus élevé.
Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées au microscope.

1.5. RESULTATS ET RAPPORT

1.5.1. Traitement des résultats

Les résultats peuvent se présenter sous forme de tableaux dans lesquels figurent pour chaque groupe d'essai :

- Le nombre d'animaux au début de l'essai.
- Le moment de la mort de chaque animal aux différentes concentrations d'exposition.
- Le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité.
- La description des manifestations de toxicité et le pourcentage d'animaux affectés par chaque type de lésion.
- Les résultats d'autopsie.

Les animaux présentant des démonstrations d'effets douloureux causés par la substance testée sont euthanasiés durant l'essai pour une raison éthique. Ils sont comptabilisés comme morts imputables à la substance.

Tous les résultats observés d'une manière quantitative ou fortuite doivent être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée.

1.5.2. Evaluation des résultats

Pour les études de toxicité aiguë, la valeur de la CL 50 correspond à une mesure relativement grossière qui n'a d'intérêt qu'en tant que valeur de référence dans des buts de classification et d'étiquetage. De plus, elle correspond à l'expression du potentiel létal éventuel de la substance à tester suite à une exposition par inhalation. Si les durées d'expositions utilisées sont identiques, une comparaison des valeurs des CL 50 entre elles est possible. L'extrapolation à l'homme des résultats de la CL 50 et des études de toxicité aiguë obtenus sur des animaux n'a de valeur que dans une mesure très limitée.

Cependant, les données issues de ces études de toxicité aiguë permettent de fournir des renseignements utiles aux divers centres anti-poisons concernant le profil toxicologique d'une substance incriminée dans une intoxication par inhalation.

Concernant les études de toxicité à 14 ou 28 jours, elles fournissent des renseignements sur les effets d'une exposition répétée par inhalation et peuvent démontrer la nécessité d'études complémentaires à plus long terme. Elles peuvent également fournir des informations sur le choix des concentrations dans le cas d'études à plus long terme.

Quant aux études subchroniques à 90 jours, si elles sont correctement menées, elles fournissent une estimation satisfaisante de la dose sans effet.

Dans toutes les études de toxicité par inhalation, les résultats doivent être évalués conjointement avec les résultats d'études précédentes et être interprétés en fonction des effets toxiques observés, des résultats d'autopsie et des résultats histopathologiques.

L'évaluation doit considérer la relation qui existe entre, d'une part, l'exposition des animaux à la substance à tester (concentration et durée d'exposition) et, d'autre part, l'incidence ainsi que l'importance de toutes les anomalies (comportementales, cliniques...), des lésions macroscopiques, des organes cibles identifiés, des changements de poids, des effets sur le taux de mortalité et de tout autre effet toxique général ou spécifique.

1.5.3. Rapport

Les informations ci-dessous doivent être présentes dans le rapport d'essai :

1.5.3.1. Conditions expérimentales

- Description de l'appareil d'exposition utilisée : conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement de l'air, traitement de l'air évacué et éventuellement modalités du séjour des animaux en chambre d'essai lorsqu'on en utilise une.

- Description de l'équipement de mesure de la température, de l'humidité, de la concentration et de la granulométrie des particules d'aérosols.

1.5.3.2. Données concernant l'exposition

Elles peuvent se présenter sous forme de tableau fournissant les valeurs moyennes et une mesure de variabilité (écart-type par exemple). Ces données sont :

- Les débits d'air à travers l'équipement respiratoire
- La température et l'humidité de l'air
- Les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans l'équipement respiratoire divisée par le volume d'air)
- Les concentrations réelles dans la zone de respiration du dispositif d'essai
- La répartition granulométrique (par exemple, diamètre aérodynamique moyen des particules et écart-type par rapport à la moyenne).

1.5.3.3. Données concernant les animaux

- Espèce utilisée
- Tableau des effets toxiques par sexe et par concentration d'exposition (exemples : nombre d'animaux exposés à la substance; nombre d'animaux présentant des manifestations de toxicité; nombre d'animaux morts ou euthanasiés au cours de l'essai ...)
- Moment de la mort pendant ou après l'exposition ou nombre d'animaux ayant survécu au terme de cette étude
- Effets toxiques ou autres
- Moment de l'observation de chaque manifestation anormale et son évolution ultérieure
- Autopsie et résultats histopathologiques dont le relevé des lésions et des anomalies observées.
- Données relatives à la nourriture et au poids corporel
- Essais biochimiques et hématologiques
- Traitement statistique des résultats.

1.6. SECURITE DU PERSONNEL AU COURS DES ESSAIS DE TOXICITE PAR INHALATION

Les essais de toxicologie par inhalation doivent être conduits avec une surveillance constante et selon les bonnes pratiques de laboratoire.

Les personnes travaillant dans des zones d'expérimentation qui génèrent et utilisent des agents chimiques aérogènes doivent être protégées rigoureusement. Les mesures de base employées pour prévenir tout contact avec un produit chimique ou leur propagation à l'intérieur du laboratoire doivent être continuellement renforcées.

Afin d'éviter l'inhalation d'agent test par les personnes travaillant dans la zone expérimentale, différentes protections peuvent être utilisées. Des masques procurent une protection minimale et seulement contre les grosses particules de poussière. En ce qui concerne la protection chimique, des respirateurs à cartouche peuvent être utilisés contre certaines vapeurs organiques ou poussières durant le temps d'exposition potentielle (par exemple, transfert d'agents test, retrait des animaux de la chambre d'exposition, observation des animaux suite à une exposition du corps entier). Des respirateurs avec des réserves d'air devraient être utilisés lors de manipulation de containers ouverts contenant des substances très toxiques, et ces transferts devraient être réalisés à l'intérieur d'une hotte fonctionnelle de laboratoire. De même, des respirateurs avec des réserves d'air devraient être utilisés lors de manipulation des animaux exposés à des agents toxiques.

Le plus important lorsque l'on réalise des essais toxicologiques par inhalation est de se souvenir que l'animal doit être isolé. La zone elle-même doit être isolée de telle sorte que seules les personnes impliquées dans l'expérimentation aient accès aux lieux. Des mesures spécifiques peuvent être prises en fonction du type de test, de la quantité d'agent chimique devant être manipulé durant le test et de la toxicité de cet agent chimique.

Enfin, la sécurité du personnel nécessite de la prudence sur la façon dont les chambres sont vidées de leur contenu (185).

Comme nous venons de le décrire, les essais toxicologiques par inhalation ont des conséquences biologiques et lésionnelles au niveau du système respiratoire du chien. Nous allons désormais étudier quelles sont les principales réponses toxicologiques observées suite à une exposition par inhalation à un toxique aérien.

2. LES REACTIONS DU SYSTEME RESPIRATOIRE SUITE A L'INHALATION D'AGENTS TOXIQUES (116, 157, 259)

La connaissance de la structure et des fonctions du système respiratoire abordées dans la première partie est essentielle à la compréhension des réponses de l'appareil respiratoire suite à l'inhalation de substances toxiques.

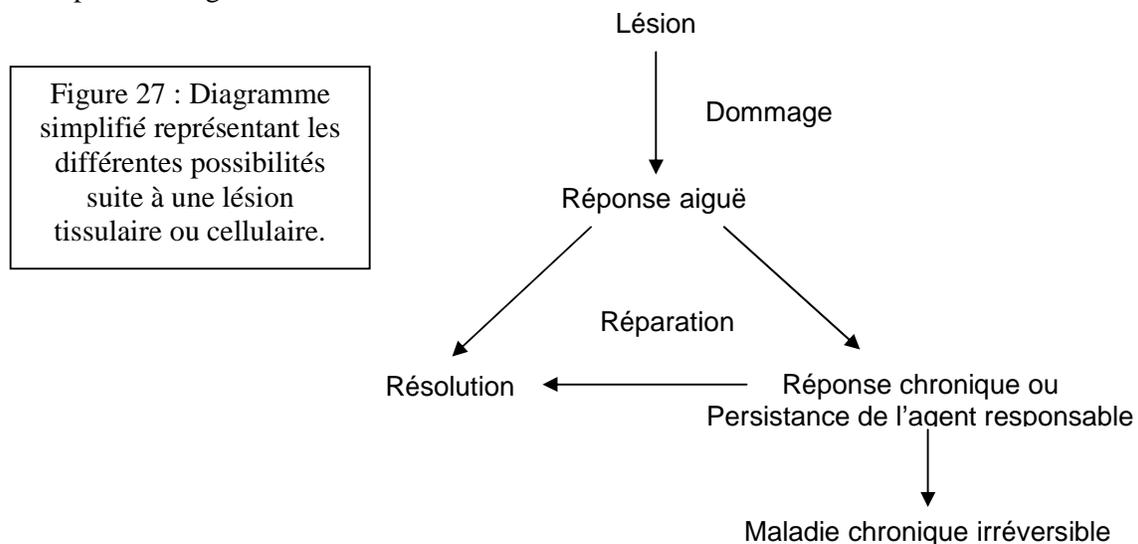
2.1. PHYSIOPATHOLOGIE DES REPONSES TOXICOLOGIQUES AU NIVEAU DU SYSTEME RESPIRATOIRE (103, 165)

Les facteurs généraux qui affectent la distribution et la nature de la réponse toxicologique sont : la nature, le dépôt régional et la persistance de l'agent toxique dans le système respiratoire, la durée de l'exposition et la susceptibilité tissulaire ou cellulaire.

Une lésion au niveau de l'appareil respiratoire se manifeste en général par une dégénérescence ou une nécrose cellulaire. La réponse de l'organisme à cette lésion est schématisée dans la figure 27.

La réponse aiguë qui suit se caractérise par une inflammation pour éliminer les débris cellulaires et l'agent responsable ainsi que des tentatives de régénération pour restaurer l'intégrité structurale. Si ceci est accompli avec succès, une réparation complète aussi bien au niveau structural que fonctionnel a lieu.

Une réponse plus chronique peut avoir lieu si la lésion ou l'inflammation qui l'accompagne sont plus sévères ou si l'agent responsable persiste dans les tissus ou s'il existe des expositions multiples à cet agent.



2.1.1. Lésion, régénération et réparation(76)

L'exposition par inhalation du système respiratoire à un toxique entraîne des lésions cellulaires. Ces lésions peuvent être réversibles avec une inflammation minimale et une réparation complète grâce à une régénération épithéliale (par exemple une production altérée de mucus ou une perte de cils). Des lésions plus sévères, accompagnées d'une nécrose non spécifique ou suite à des expositions chroniques à des toxiques, peuvent être irréversibles

L'inhalation d'un toxique peut affecter de façon non spécifique l'ensemble des cellules au niveau d'une région donnée de l'appareil respiratoire. Ceci se produit lors de l'inhalation d'une substance tellement toxique que l'ensemble des cellules en contact avec cette substance sont lésées. Un exemple peut être l'aspiration d'une solution caustique qui causera un dommage diffus au niveau de l'épithélium aérifère et des alvéoles associées.

Un toxique peut également léser sélectivement un seul type cellulaire au niveau d'une région spécifique du système respiratoire. Par exemple, les cellules de Clara ou les cellules de l'épithélium olfactif, en raison de leur importante concentration intracellulaire en cytochrome P450, peuvent être endommagées par des toxiques qui nécessitent une activation métabolique.

Indépendamment du mécanisme de toxicité et du type cellulaire impliqués, une nécrose cellulaire est suivie par des processus de réparation relativement stéréotypés qui incluent une prolifération de cellules indifférenciées et une inflammation. Il s'agit d'une accélération du processus normal de renouvellement cellulaire par lequel l'intégrité tissulaire est maintenue. Dans certaines situations, la prolifération cellulaire peut être initiée par la migration de cellules inflammatoires dans les poumons.

2.1.2. Réponse naso-pharyngée à la lésion(124)

La région naso-pharyngée est susceptible aux lésions causées par l'inhalation d'agents en raison de sa localisation anatomique.

Les toxiques affectant la fonction naso-pharyngée peuvent affaiblir le flux muco-ciliaire, changer la résistance nasale à l'écoulement de l'air et irriter ou endommager la muqueuse nasale. Des dommages au niveau des cellules neuronales de l'épithélium olfactif peuvent entraîner une diminution du sens de l'olfaction ou une anosmie.

Les agents chimiques et biologiques déposés dans la région naso-pharyngée peuvent conduire à une inflammation (rhinite), une irritation, une congestion, une dégénérescence et une nécrose, une ulcération, une métaplasie, une hyperplasie et des lésions prolifératives comme des néoplasies. Ceci est observé avec les grosses particules présentes dans l'atmosphère, telles le sulfure ou l'oxyde de nickel et le chrome, qui se déposent principalement dans les fosses nasales. Afin de prévenir l'accumulation de ces substances déposées et donc des effets possibles à long terme sur la santé, il est important qu'elles soient éliminées rapidement.

La première réponse aiguë est en général l'inflammation. Dans certaines situations, cette réponse aiguë possède une composante allergique et l'accumulation d'éosinophiles et la dégranulation de mastocytes en sont les caractéristiques de base. Dans tous les cas, le tissu conjonctif lâche devient gonflé et oedémateux, entraînant souvent une obstruction nasale.

La dégénérescence et la nécrose cellulaires sont en général suivies par une prolifération cellulaire afin de réparer l'épithélium endommagé. Ces processus de réparation peuvent conduire à une restauration complète de l'épithélium normal, un remplacement de l'épithélium olfactif par un épithélium de type respiratoire, une fibrose, une hyperplasie ou une métaplasie squameuse. L'hyperplasie est causée par une prolifération cellulaire excessive. Il est important de noter qu'une augmentation du turnover cellulaire prédispose à des phénomènes de cancérogenèse puisque la synthèse d'ADN accrue augmente la probabilité de mutation.

Les tumeurs d'origine épithéliale les plus répandues au niveau de la cavité nasale des chiens sont les papillomes, les adénomes, les adénocarcinomes, les carcinomes à cellules squameuses (usuellement précédés d'une métaplasie squameuse de l'épithélium) et les carcinomes indifférenciés (80).

2.1.3. Réponse des conduits aérifères à la lésion (52)

Les lésions de l'épithélium aérifère diminuent l'efficacité de la clairance muco-ciliaire à cause des changements au niveau du mucus ou des cellules ciliées. Ceci sera étudiée dans le paragraphe 2.4..

- Cas de la bronchite chronique :

La bronchite chronique est une pathologie de type obstructif qui se caractérise chez le chien par une expiration difficile et des difficultés respiratoires au cours d'un effort physique. Elle est causée par des expositions chroniques aux polluants atmosphériques, tels que les gaz irritants.

L'épaisseur de la paroi bronchique augmente et la distribution de la ventilation n'est pas uniforme. Les bronchites chroniques se manifestent par une production excessive de mucus bronchique du fait de l'augmentation considérable du nombre des cellules muqueuses. De plus, une toux chronique et des expectorations récurrentes sont associées. Ces deux phénomènes améliorent le mécanisme de clairance : ils favorisent l'élimination de l'excès de mucus car le transport muco-ciliaire est altéré.

L'examen histologique des conduits aérifères bronchiques montre une hypertrophie des glandes à mucus dans les grosses bronches, des changements inflammatoires chroniques, dont une infiltration cellulaire et une accumulation de fibroblastes et de tissu conjonctif, un oedème et une augmentation possible des muscles lisses des conduits aérifères. Lors des étapes précoces, ces effets sont potentiellement réversibles mais lors des étapes avancées, ils sont irréversibles.

- Cas de la réactivité des conduits aérifères :

Les gros conduits aérifères sont entourés de muscles lisses bronchiques qui aident à maintenir le tonus et le diamètre des voies aériennes durant l'expansion et la contraction des poumons. Le tonus des muscles lisses bronchiques est normalement régulé par le système nerveux autonome. Une contraction réflexe se produit lorsque des récepteurs présents au niveau de la trachée et des grosses bronches sont stimulés par divers polluants atmosphériques, la fumée de cigarette ou des gaz irritants tels que le toluène, le dioxyde d'azote ou de soufre... Cette bronchoconstriction cause une diminution du diamètre des

conduits aérifères et une augmentation correspondante de la résistance à l'écoulement de l'air. Les symptômes caractéristiques associés incluent une toux, une dyspnée et une respiration sifflante. Un exercice physique peut potentialiser ce problème.

Les tumeurs d'origine épithéliale les plus rencontrées au niveau du larynx et de la trachée des chiens sont les oncocytomes (tumeurs habituellement bénignes dont la structure est de nature glandulaire, correspondant à une variété d'adénome) et les carcinomes à cellules squameuses.

2.1.4. Réponse du parenchyme pulmonaire à la lésion (32)

En fonction du compartiment touché, les principales lésions pulmonaires sont :

2.1.4.1. Lésion épithéliale

Suite à une lésion de l'épithélium alvéolaire, la récupération fait suite à une réparation rapide. La réépithélialisation de la zone respiratoire endommagée est cruciale pour le maintien d'un fonctionnement pulmonaire normal.

Le type et l'étendue de la lésion déterminent si la réplication cellulaire conduit à une restauration de la structure normale ou à un remodelage anormal, qui peut mener à une altération anatomique causée par une importante fibroprolifération.

2.1.4.1.1. Simple réparation

La plupart des toxiques affectent l'épithélium alvéolaire. La réponse de l'épithélium respiratoire alvéolaire à ces lésions toxiques peut entraîner une nécrose et la perte ultérieure des cellules de type I qui sont les plus sensibles.

La mort des cellules de type I mènent à la perte de l'inhibition de contact avec les cellules de réserve de type II qui prolifèrent (222, 223). Ceci a pour conséquence que la paroi des alvéoles lésées est constituée en majorité par les cellules de type II, ce qui donne une apparence glandulaire. De plus, ces cellules de type II sont plus résistantes et possèdent une membrane plus épaisse, ce qui provoque une diminution de la capacité de diffusion des gaz.

A certaines étapes, soit quand l'exposition toxique s'arrête, soit quand ces cellules pour une raison ou pour une autre deviennent résistantes, l'adaptation se produit. Elle se traduit par un aplanissement des cellules de type II, une perte de l'excès de cellules de type II et le passage à un revêtement épithélial de type I. Dans la plupart des cas, une lésion minimale peut évoluer en une restauration complète de l'architecture pulmonaire normale.

Ce type de lésion est typiquement observée suite à l'exposition à des toxiques tels que l'ozone, le dioxyde d'azote ou de soufre et certains métaux comme le cadmium.

2.1.4.1.2. Lésion compliquée et réparation

La lésion est similaire mais entraîne une mort cellulaire plus importante et une réponse inflammatoire avec une exsudation de protéines riches en fibrine, de neutrophiles et de débris dans les alvéoles lors du processus de réparation. Cet exsudat devient organisé par la migration rapide puis la prolifération de fibroblastes au niveau de la zone endommagée. Le dépôt de tissu conjonctif convertit l'exsudat en tissu fibreux qui se contracte pour former un tissu cicatriciel dense. Ceci oblitère l'architecture des espaces aériens, conduisant à une fibrose alvéolaire.

L'épithélium de surface montre la même évolution que lors d'un simple dommage, à l'exception que les cellules de type I ne sont jamais complètement rétablies sur le tissu cicatriciel.

2.1.4.2. Lésion endothéliale

Lorsque des cellules endothéliales sont lésées ou meurent, il se produit une augmentation de la perméabilité vasculaire et une thrombose. Un dommage significatif des cellules endothéliales apparaît après l'exposition à l'ozone.

Les plaquettes peuvent adhérer à la membrane basale exposée provoquant une libération d'agents vaso-actifs. La perméabilité vasculaire accrue permet la fuite de fluide dans les espaces interstitiels et les vaisseaux lymphatiques et éventuellement dans les espaces alvéolaires.

2.1.4.3. Lésion interstitielle (75)

Comme nous l'avons décrit en histologie, l'interstitium est la partie des poumons située entre les espaces aériens et les vaisseaux sanguins. Il constitue la trame ou le "squelette" des poumons (réseau de collagène et de fibres élastiques) et contient des cellules structurales et de défense (fibroblastes, macrophages, neutrophiles, éosinophiles et mastocytes). Un composé additionnel est l'espace potentiel existant entre l'épithélium, l'endothélium et le squelette des poumons qui peut rapidement être rempli par un fluide d'œdème et des cellules inflammatoires. Les agents chimiques sont fréquemment à l'origine d'un type similaire de pneumonie interstitielle, tandis que les particules telles que la silice peuvent provoquer une réaction similaire à celle induite par la tuberculose et certains agents fongiques.

Un effet de la réparation compliquée d'une lésion épithéliale est que l'exsudat alvéolaire organisé devient incorporé dans l'interstitium pulmonaire. Ceci a deux conséquences : premièrement, la structure du collagène des zones affectées devient fine et moins élastique de sorte que les mouvements d'air au niveau de cette zone sont diminués; secondement, l'interstitium entre les conduits aérifères et les vaisseaux sanguins est plus large de sorte que les gaz ne diffusent plus aussi facilement que dans un poumon normal. Ce processus interstitiel est appelé fibrose interstitielle et sera développé dans le paragraphe 2.2.4..

2.2. LES PRINCIPALES REPONSES LESIONNELLES AU NIVEAU DU SYSTEME RESPIRATOIRE (137)

2.2.1. Inflammation pulmonaire (38, 58, 77)

Une inflammation causée par l'inhalation de toxiques est à l'origine de dommages au niveau du septum alvéolaire. Sous des conditions normales, les couches de cellules endothéliales et épithéliales alvéolaires composant la barrière air-sang contrôlent le passage des fluides et des cellules entre les espaces aériens des poumons et l'interstitium.

Lors de la phase aiguë, l'endothélium capillaire et les cellules épithéliales alvéolaires sont lésées. Des dommages au niveau de cette barrière délicate peuvent causer une réponse inflammatoire et un affaiblissement de la fonction pulmonaire. Des changements de perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire mènent à un œdème et un afflux de cellules sanguines (neutrophiles, macrophages et éosinophiles). La résolution d'une lésion aiguë se produit par une prolifération de cellules souches qui remplacent l'endothélium et l'épithélium endommagés.

Si la lésion est plus sévère ou si l'exposition est chronique avec de multiples épisodes, l'inflammation persiste et la régénération normale est inhibée. On observe alors une prolifération de fibroblastes et un dépôt de collagène qui mènent à une fibrose est progressive et irréversible.

2.2.2. Irritation de l'appareil respiratoire (35, 221, cf 2ème partie, paragraphe 3.2.3.)

Le nombre de produits chimiques susceptibles de provoquer une irritation du système respiratoire est considérable. En effet, de nombreux composés responsables de la pollution de l'air constituent des irritants respiratoires.

Bien que l'irritation de l'appareil respiratoire coïncide souvent avec un effet transitoire et relativement faible, elle correspond à une des réponses des conduits aérifères la plus significative pour les toxicologistes. L'irritation respiratoire est la base la plus utilisée pour mettre en place des limites d'exposition professionnelles telles que les TLV (Threshold Limit Value) (8).

L'irritation correspond au premier effet délétère observable au niveau des conduits aérifères et se produit à des concentrations relativement faibles qui peuvent être compatibles avec des concentrations rencontrées dans l'environnement humain ou animal.

Les réponses peuvent être faibles à sévères en fonction de la concentration et sont en général réversibles. L'irritation locale déclenche des réflexes sécrétoires et moteurs causés par l'excitation des terminaisons nerveuses. Les effets précoces produits incluent une sensation de brûlure au niveau des yeux et des conduits aérifères supérieurs, de la toux, de l'éternuement et une bronchoconstriction causée par l'irritation des conduits aérifères incluant le larynx.

Bien que les réponses initiales aux irritants sont des réflexes médiés par des terminaisons nerveuses, des expositions prolongées ou répétées provoquent des altérations profondes de l'épithélium trachéo-broncho-pulmonaire, des lésions tissulaires ou cellulaires, un œdème et une inflammation.

De tels effets structuraux induits par des irritants ont été démontrés pour la plupart des irritants pulmonaires et sensoriels tels que l'ozone, le formaldéhyde, l'acide sulfurique (11), le dioxyde d'azote... En général, les substances qui produisent une irritation respiratoire ont le potentiel de provoquer des effets à long terme suite à une exposition répétée.

2.2.3. Oedème pulmonaire(59, 179, figure 28)

Un oedème pulmonaire se produit lors d'une modification des propriétés hémodynamiques ou d'une augmentation de la perméabilité de la barrière air-sang. L'oedème est souvent un signe de lésion pulmonaire aiguë et exsudative.

Cliniquement, l'oedème pulmonaire se caractérise chez le chien par une orthopnée puis une polypnée (respiration rapide et superficielle), voire une discordance. On peut noter la présence d'une toux d'abord forte, rauque, quinteuse et grasse, puis petite et courte en phase terminale. Il existe également un jetage spumeux, parfois rosé au pourtour des narines, et des crépitements en fin d'inspiration sont audibles au stéthoscope.

A l'autopsie, un poumon oedémateux est plus gros et plus ferme qu'un poumon normal et ne se collabe pas. Un oedème pulmonaire est en général quantifié par des mesures gravimétriques du contenu en eau des poumons. Une alternative à la mise en évidence de la présence d'un oedème pulmonaire est la pesée du poumon entier ou d'une fraction d'un poumon avant et après dessiccation.

Des modifications de la perméabilité capillaire peuvent être causées par des lésions des cellules endothéliales ou par des médiateurs de l'inflammation. De nombreuses substances toxiques inhalées peuvent causer des oedèmes pulmonaires par effet direct sur l'endothélium. Les gaz toxiques comme le dioxyde d'azote sont à l'origine de lésions cellulaires par peroxydation des membranes. De nombreux irritants acides et alcalins provoquent une nécrose cellulaire et une augmentation de la perméabilité alvéolaire. La perméabilité accrue des membranes lésées est la cause de l'oedème. Le liquide d'oedème ainsi produit s'accumule au niveau des voies aériennes plutôt que de s'accumuler dans l'espace extracellulaire comme cela se produit dans d'autres tissus. De tels effets sont constatés suite à l'inhalation de particules de petite taille telles les dérivés du nickel, du bore ou du béryllium. D'autres agents comme l'ammoniac et le phosgène peuvent induire après un certain temps de latence un oedème aigu du poumon.

Il est à noter que les médiateurs qui altèrent la perméabilité endothéliale peuvent être libérés par des mastocytes (histamine) durant des réponses allergiques, des agrégats plaquettaires et des cellules phagocytaires lorsqu'elles migrent à travers l'endothélium.

Les conséquences biologiques d'un oedème pulmonaire toxique compromettent non seulement la structure et la fonction pulmonaires mais provoquent également des anomalies qui peuvent perdurer même après la résolution du processus oedémateux. Ainsi, un oedème pulmonaire interfère avec la fonction d'échange gazeux respiratoire des poumons. En effet, le fluide d'oedème limite le transfert par diffusion de l'oxygène et du dioxyde de carbone et altère également la relation ventilation-perfusion.

Lors de lésion minimale, les processus de réparation permettent un retour à la normale. Cependant, lors de lésion sévère, une inflammation et éventuellement une fibrose peuvent avoir lieu.

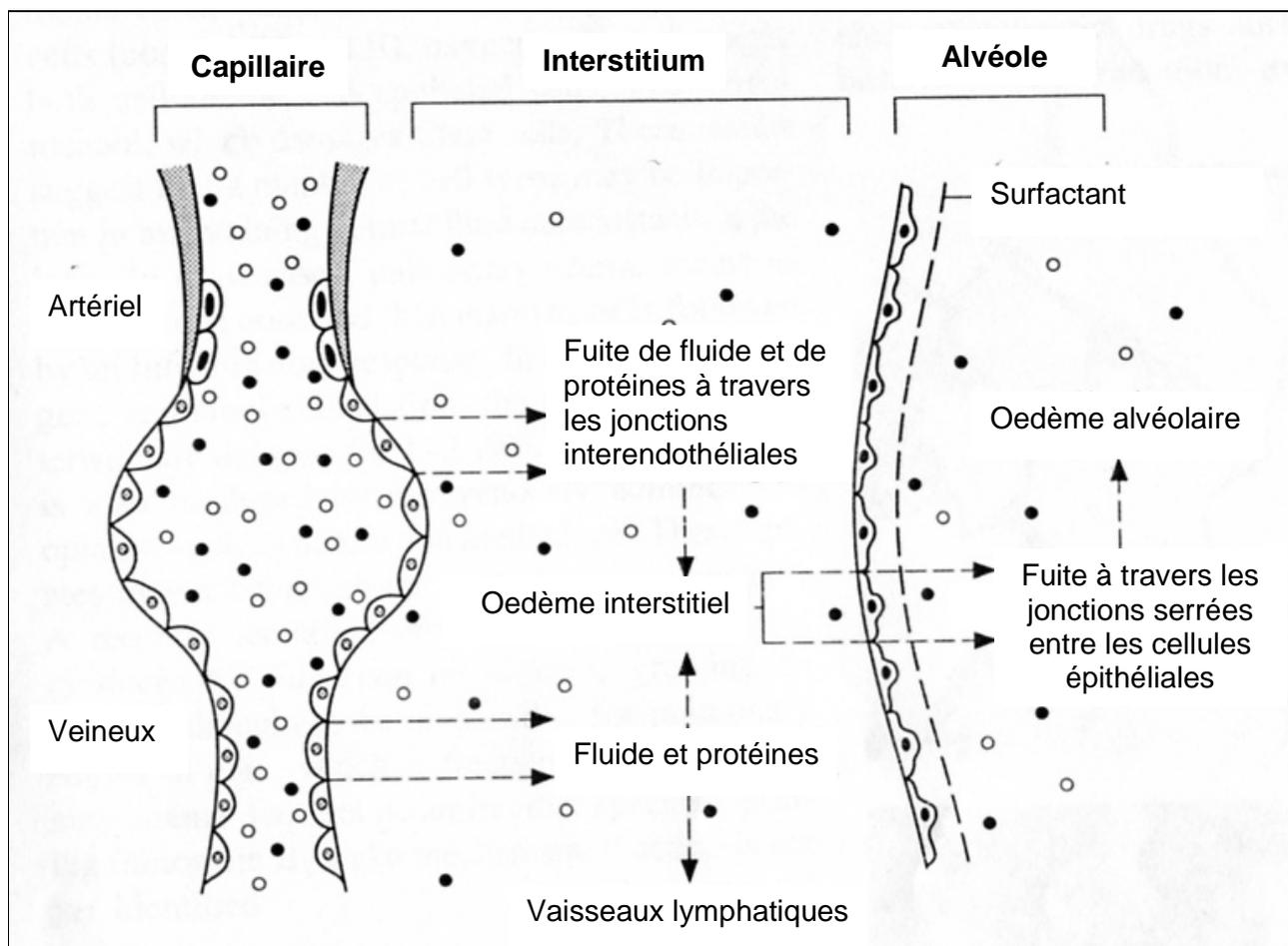


Figure 28 : Représentation schématique de l'œdème pulmonaire (103).

2.2.4. Fibrose pulmonaire(101, 102, 139, 179, 199, 258)

La fibrose est une maladie grave et débilitante qui se caractérise par une quantité accrue de collagène, une localisation anormale du collagène déposé ou une nature anormale du collagène lui-même.

Une augmentation du collagène pulmonaire peut résulter d'un dépôt de collagène accru soit par une augmentation de la synthèse par des cellules préexistantes ou par un nombre plus élevé des cellules synthétisant le collagène soit par une diminution de la dégradation de collagène.

L'excès de collagène est observé au niveau de l'interstitium alvéolaire, des conduits alvéolaires et des bronchioles respiratoires. Une fois que le collagène a été déposé, la fibrose est en général irréversible. Le fibroblaste est la principale cellule impliquée dans la synthèse de collagène.

Le dépôt du collagène au niveau d'une localisation anormale se produit lorsque la membrane basale, l'épithélium ou l'endothélium sont interrompus. Le collagène peut alors se déposer au niveau des espaces alvéolaires, des capillaires ou des conduits aérifères.

D'un point de vue morphologique, la fibrose se définit comme une augmentation du tissu conjonctif observable au niveau microscopique. Les poumons sont plus petits et plus rigides. La fibrose peut se distribuer de façon diffuse ou focale au niveau des poumons.

D'un point de vue fonctionnel, la fibrose pulmonaire mène à une diminution des capacités de diffusion et de la compliance pulmonaire.

Une fibrose pulmonaire peut être la conséquence de l'inhalation prolongée de différents toxiques, comme par exemple l'inhalation de silice, d'amiante, d'oxyde de fer, de béryllium, de gaz toxiques (ozone, dioxyde d'azote...), de fumée de cigarette...

- La silicose est causée par l'inhalation répétée de formes cristallines de silice (dioxyde de silice). Le quartz est la forme la plus stable et inerte de ces formes cristallines. Lors de chauffage (éruption volcanique, extraction minière), le quartz se transforme en deux formes plus fibrogènes (cristobalite et tridymite). La réaction fibrotique du parenchyme pulmonaire est causée par la lyse des macrophages suite à la libération des enzymes lysosomaux par rupture de la membrane de ces lysosomes (48). Les macrophages libèrent des facteurs stimulant les fibroblastes pour la formation de collagène (28). Des nodules silicotiques se forment ainsi et s'agglomèrent en masses pseudotumorales à l'origine de dyspnée pouvant évoluer en silicotuberculose ou bronchite chronique voire, à long terme, en insuffisance respiratoire.

- L'asbestose est une fibrose pulmonaire causée par l'inhalation réitérée d'amiante. Ce terme regroupe différents silicates hydratés de calcium ou de magnésium, de texture fibreuse. La toxicité de l'amiante dépend de ses propriétés physico-chimiques : les fibres les plus dangereuses auraient une longueur de 5 µm et un diamètre de 0.3 µm. La fibrose pulmonaire induite par l'inhalation d'amiante peut évoluer en mésothéliome (tumeur des cellules tapissant la plèvre et le péritoine) ou en carcinome bronchique. De plus, les effets fibrosants et cancérogènes causés par les fibres d'amiante sont causés par la formation d'espèces réactives oxygénées. Le chien a fait l'objet de nombreuses études concernant la toxicité de l'amiante (36, 94, 119).

- Enfin, il existe d'autres substances fibrogènes comme la poussière de talc (talcose), charbon (anthracose), kaolin (kaolinose), béryllium (bérylliose), aluminium (aluminose), carbures de tungstène...

2.2.5. Emphysème (122, 135, 232)

D'un point de vue anatomique, l'emphysème se définit par un agrandissement permanent, irrégulier et anormal des espaces aériens distaux des bronchioles terminales, accompagné d'une destruction des parois alvéolaires mais sans fibrose évidente (231).

Il est en général la conséquence d'une exposition chronique à faible dose à des agents toxiques complexes tels que la fumée de cigarette, l'aluminium, l'oxyde de cadmium, les oxydes d'azote et l'ozone.

Lorsqu'il est cliniquement symptomatique, l'emphysème se présente comme une maladie pulmonaire obstructive chronique et est fréquemment associé à une bronchite chronique.

Une diminution de l'élasticité et une augmentation du volume pulmonaire sont les caractéristiques physiologiques spécifiques de l'emphysème.

A l'examen nécropsique, le poumon emphysémateux a une taille et une compliance augmentées et ne se collabe pas quand la cavité thoracique est ouverte.

La destruction de la surface d'échange gazeux entraîne une perte de la surface totale pulmonaire et une diminution de la capacité des poumons à réaliser les échanges gazeux. En effet, la distension et le gonflement des poumons les rendent inaptes aux échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone en raison de la perte tissulaire et du piégeage de l'air.

Quand certains agents chimiques sont inhalés de façon répétée, ils provoquent des lésions cellulaires et une réponse inflammatoire. Au cours de ces processus, des protéases (comme les élastases) sont libérées durant la phagocytose ou la mort cellulaire. Ces substances réactives peuvent dégrader l'élastine et le collagène pulmonaires, entraînant une destruction de la structure de support de l'alvéole. Afin de maintenir l'intégrité structurale dans de telles conditions, les poumons peuvent répondre avec des modificateurs biochimiques tels que les anti-protéases.

La pathogenèse de l'emphysème commence par une lésion du tissu conjonctif pulmonaire, en particulier au niveau des fibres élastiques lorsque la balance protéase-anti-protéase est altérée. La destruction du tissu pulmonaire se produit quand l'activité protéase prédomine, soit par une augmentation excessive des protéases, soit par une inhibition des anti-protéases. De ce fait, les fibres élastiques entourant et maintenant les alvéoles et les bronches sont endommagées. Ceci a été reproduit lors d'expérimentations animales par l'instillation intra-trachéale d'élastase ou d'autres enzymes protéolytiques pouvant digérer d'élastine.

2.2.6. Asphyxie et suffocation

Si le mécanisme régulateur des mouvements respiratoires est faussé, il s'ensuit des phénomènes de suffocation et d'asphyxie.

La suffocation, qui peut aboutir à l'asphyxie, se produit sous l'action d'agents irritants. Elle résulte de deux réflexes antagonistes : l'un de fermeture, qui naît au niveau des voies antérieures et qui tend à ralentir la respiration, tandis que l'autre, d'ouverture, naît dans les voies profondes et tend à l'accélérer.

L'asphyxie résulte d'une privation d'oxygène et d'une surcharge du sang en dioxyde de carbone. Les causes d'asphyxie sont multiples : syncope respiratoire par inhibition du centre de la respiration (anesthésiques), atmosphère trop pauvre en oxygène ou trop riche en dioxyde de carbone (air confiné), inhibition de la biosynthèse de l'hémoglobine ou impossibilité de l'hémoglobine à fixer et transporter l'oxygène (formation de carboxyhémoglobine lors d'une intoxication au monoxyde de carbone)...

2.2.7. Réponse allergique

Certains produits réactifs comme le di-isocyanate de toluène se lient à des protéines sanguines et pulmonaires pour former des antigènes stimulant la formation d'anticorps. La réponse observée est alors une bronchoconstriction déclenchée par la réaction entre les antigènes et les anticorps circulants ou fixés. Des expositions prolongées peuvent causer d'autres effets pulmonaires comme une bronchite chronique ou une fibrose.

2.2.8. Cancer pulmonaire(65, 171)

Chez le chien, l'apparition spontanée de tumeurs pulmonaires malignes est relativement rare à moins que l'animal ait atteint un âge avancé.

Les tumeurs pulmonaires du chien sont d'un grand intérêt puisque le chien, en tant qu'animal de compagnie, est exposé à un environnement similaire à celui de l'homme. En expérimentation, l'exposition à des cancérigènes par inhalation ou instillation intra-trachéale produit rapidement des tumeurs pulmonaires. Les carcinomes ont été induits chez les chiens par inhalation de fumée de cigarette (119).

Les adénocarcinomes bronchiolo-alvéolaires sont la tumeur pulmonaire la plus fréquente chez les chiens.

Le prémisses de base de la recherche en cancérogénèse est qu'une substance qui affecte les cellules animales jusqu'à causer un cancer a de grande chance d'affecter les cellules humaines de la même façon. Cette information peut être utilisée comme un indicateur pour prédire le risque cancérogène potentiel pour l'homme.

Les cancérogènes peuvent être divisés en deux groupes généraux : ceux qui agissent directement et ceux qui agissent indirectement (201, 209, 234).

Les premiers interagissent avec les constituants cellulaires tels que les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Il existe peu de cancérogènes d'action directe, comme par exemple l'oxyde d'éthylène.

Les cancérogènes qui agissent indirectement ont besoin d'une activation métabolique avant d'interagir avec les macromolécules cellulaires. Ces agents sont souvent qualifiés de précancérogènes et incluent certains hydrocarbures aromatiques cycliques, polycycliques (benzène) ou aliphatiques (chlorure de méthylène et pesticides), des nitrosamines et d'autres agents chimiques tels que le formaldéhyde.

Les cancérogènes d'action directe ou indirecte peuvent au final réagir avec le matériel génétique de la cellule. Ils sont alors dénommés cancérogènes génotoxiques.

Des exemples de cancérogènes inorganiques sont l'arsenic, l'amiante et le nickel. La forme chimique est importante dans la détermination de la dose-réponse. Par exemple, le sulfate de béryllium est plus cancérogène que l'oxyde de béryllium. La différence est liée à la solubilité de ces composés dans les poumons et à la dose finale de ces agents chimiques dans les tissus cibles.

2.3. EFFETS DES TOXIQUES SUR LES DEFENSES PULMONAIRES

Le système de défense de l'appareil respiratoire est l'une des principales cibles dont la fonction peut être endommagée par l'exposition à une grande variété d'agents chimiques environnementaux.

Les paramètres de défense de l'hôte qui ont été les plus largement utilisés pour étudier l'association entre des toxiques aériens et des pathologies pulmonaires incluent le dysfonctionnement de la clairance muco-ciliaire, les activités fonctionnelles et biochimiques des macrophages alvéolaires, la compétence immunologique et la susceptibilité aux maladies infectieuses. Une augmentation de la morbidité respiratoire et un affaiblissement de la clairance pulmonaire peuvent se produire à des niveaux ambiants de pollution atmosphérique et sont associés à une susceptibilité aux microorganismes pathogéniques.

2.3.1. Dysfonctionnement de la clairance muco-ciliaire(133, 210)

Un composé fondamental du système de défense pulmonaire est le mécanisme de clairance muco-ciliaire des toxiques déposés au niveau des conduits aérifères. Ces mécanismes apparaissent être similaires chez la plupart des mammifères. L'efficacité de cette défense a été déterminée par la mesure du taux de transport des particules déposées, de la fréquence des battements ciliaires, du taux de production et de transport du mucus et par l'évaluation de l'intégrité des cellules ciliées et des propriétés physico-chimiques de la couche de mucus.

L'exposition par inhalation à certains toxiques peut altérer de façon significative l'efficacité et la rapidité de la clairance de la région trachéo-bronchique et donc augmenter la susceptibilité aux infections virales ou bactériennes. En effet, toute perturbation ou affaiblissement du système de défense muco-ciliaire peut conduire à une plus grande accumulation de substances aériennes qui, par conséquent, peuvent causer des lésions potentielles.

Certaines maladies sont associées à une altération de la clairance dans cette région. Par exemple, le transport du mucus bronchique peut être altéré chez les chiens présentant des bronchites chroniques ou certaines infections aiguës. De même, différentes pathologies telles que les rhinites ou les sinusites peuvent altérer la clairance muco-ciliaire dans cette région.

La fonction normale du système muco-ciliaire peut être altérée par un dommage ciliaire, un asynchronisme ciliaire, c'est-à-dire la perte de la coordination entre les cellules ciliaires, ou par des modifications du volume ou de la viscoélasticité de la barrière de mucus :

- Les cellules ciliées, qui se retrouvent sur une grande partie des conduits aérifères, sont les plus sensibles à l'action directe des toxiques. Elles peuvent être sélectivement endommagées par l'inhalation de toxiques. Des changements au niveau des cellules ciliées se caractérisent par des dommages morphologiques et des dysfonctionnements ciliaires qui ralentissent le fonctionnement de l'escalator muco-ciliaire.

Les cils peuvent présenter de plus petits diamètres ou longueurs et une diminution de leur densité ainsi qu'une variété de changements cytologiques.

L'exposition à une variété d'agents inhalés tels que l'ozone, le formaldéhyde, le dioxyde d'azote, la fumée de cigarette et l'acide sulfurique cause une diminution de la fréquence des battements ciliaires entraînant un ralentissement du mouvement ascendant du mucus et une réduction significative de la vitesse de transport des substances déposées.

Enfin, une exposition chimique continue peut causer une nécrose et une perte ultérieure des cellules épithéliales ciliées. Ceci est constaté suite à l'inhalation de gaz tels que le dioxyde de soufre. Rapidement après la fin de l'exposition, le tissu épithélial peut être réparé par une prolifération des cellules sécrétoires, les cellules non ciliées devenant ainsi majoritaire.

- Les cellules à mucus sont moins sensibles. Dans certains cas d'expositions chroniques, une augmentation du nombre (hyperplasie) ou une localisation anormale (métaplasie) des cellules muqueuses peuvent être observées. Si ces modifications persistent, il en résulte une obstruction des conduits aérifères et une lésion alvéolaire.

Une sécrétion accrue de mucus est une réponse commune suite à l'inhalation de toxiques tels que l'ozone, le dioxyde de soufre ou d'azote et l'ammoniac. Cet excès de mucus entraîne un ralentissement des battements ciliaires et a un effet irritant sur les terminaisons nerveuses sensorielles, déclenchant ainsi un réflexe de toux.

2.3.2. Effets sur les activités fonctionnelles et biochimiques des macrophages alvéolaires

L'efficacité des systèmes phagocytaire et lytique du macrophage détermine la stérilité et la santé des poumons.

La fonction des macrophages peut être affectée par des agents aériens et leur rôle de protection pulmonaire peut être compromis. Des modifications du nombre, de la viabilité et de la morphologie ainsi que des altérations de la capacité phagocytaire des macrophages peuvent résulter de l'exposition à divers agents chimiques (90).

Un affaiblissement de la fonction des macrophages alvéolaires altère la capacité des cellules et/ou des poumons à maintenir la stérilité à l'intérieur des régions d'échanges gazeux des poumons et à fournir un mécanisme de clairance efficace pour les particules inhalées et les débris cellulaires phagocytés par ces cellules.

Des agents chimiques tels que les émanations de véhicules ou la fumée de cigarette favorisent l'afflux de macrophages dans les poumons (146).

Par contre, les chiens souffrant d'une infection virale, d'une fibrose interstitielle ou d'une inflammation, de même les animaux qui ont été exposés à un grand nombre de gaz ou de particules inhalés, ont un nombre réduit de macrophages alvéolaires ou des macrophages non fonctionnels. Par exemple l'exposition à la silice, l'amiante, l'ozone ou l'acroléine cause au final une diminution du nombre de ces cellules de défense. Ces agents chimiques sont cytotoxiques et provoquent la lyse des macrophages suite à l'exposition (9, 63, 126, 245). Certains agents chimiques tels que le monoxyde de carbone peuvent affecter la viabilité cellulaire sans causer de lyse.

2.3.3. Compétence immunologique et susceptibilité aux maladies infectieuses

Des altérations au niveau des défenses respiratoires rendent les poumons plus vulnérables aux maladies infectieuses.

Des modèles animaux servent à démontrer les effets des agents chimiques aériens et d'associer ces effets à l'augmentation de la susceptibilité aux maladies respiratoires. Ces modèles *in vivo* combinent les effets délétères d'un toxique et le stress ajouté par la mise en contact d'un microorganisme infectieux afin de mesurer l'efficacité des défenses de l'hôte après l'exposition à un toxique. Si les mécanismes de défense de l'hôte fonctionnent normalement, il se produit une inactivation rapide des organismes inhalés qui se sont déposés dans les poumons. Cependant, si l'exposition à un polluant a causé un dysfonctionnement de ces défenses, les microorganismes proliféreront rapidement et une augmentation de l'infection pulmonaire sera notée. Ainsi, l'exposition à une substance test associée à d'autres stress environnementaux tels qu'une infection peut exacerber les effets nocifs du toxique.

3. LES METHODES D'EVALUATION DE LA TOXICITE UTILISEES LORS DES ETUDES PAR INHALATION

3.1. ETUDE DE LA FONCTION PULMONAIRE (31, 68, 155, 156)

Bien que les lésions pulmonaires causés par un agent toxique se définissent normalement par des changements morphologiques, les manifestations fonctionnelles de ces effets structuraux sont des indicateurs sensibles des réponses toxiques et des pathologies pulmonaires consécutives.

Les tests de fonction pulmonaire utilisés en expérimentation fournissent une approche sûre et non invasive pour évaluer la présence, le type et la sévérité d'un dommage pulmonaire causé par des toxiques. Ces tests sont fréquemment utilisés en collaboration avec les études histomorphologiques afin d'estimer de façon adéquate la toxicité par inhalation d'une substance. De plus, des tests spécifiques de la fonction pulmonaire peuvent détecter des changements fonctionnels ou des états pathologiques au niveau de l'appareil respiratoire en l'absence de changements structuraux durables ou détectables, comme par exemple une bronchoconstriction.

De nombreux tests sont disponibles afin d'étudier la fonction pulmonaire chez l'homme et les animaux de laboratoire. Les tests de fonction pulmonaire qui sont les plus fréquemment utilisés évaluent le modèle respiratoire (la fréquence respiratoire, les capacités et les volumes pulmonaires) (tableau 5 et figure 29). Des tests additionnels évaluent la distribution de la ventilation, les propriétés mécaniques pulmonaires (dont la compliance, la résistance des conduits aérifères et le débit de l'air), la capacité de diffusion et la quantité d'oxygène et de dioxyde de carbone dans le sang veineux et artériel (tableau 6).

Puisque des mesures similaires peuvent être réalisées chez l'homme et l'animal, des études comparatives peuvent être conduites entre ces deux espèces. En effet, les études de la fonction pulmonaire suggèrent que des changements structuraux identiques produisent des effets fonctionnels identiques chez l'homme et les animaux. Par conséquent, les effets observés sur l'animal peuvent être utilisés pour prédire les effets pulmonaires pour l'homme.

Le tableau 5 et la figure 29 définissent et schématisent les différents paramètres les plus couramment utilisés (volumes et capacités pulmonaires) pour estimer les performances fonctionnelles du système respiratoire :

| | |
|---------------------------------------|---|
| Volume courant | Volume de gaz inspiré ou expiré durant chaque cycle respiratoire (égal en moyenne à 15 mL/kg chez le chien) |
| Volume minute | Volume total inspiré ou expiré par minute |
| Volume de réserve inspiratoire | Volume d'air supplémentaire entrant dans les poumons au cours d'une inspiration forcée |
| Volume de réserve expiratoire | Volume d'air supplémentaire pouvant être chassé des poumons au cours d'une expiration forcée |
| Capacité pulmonaire totale | Volume de gaz présent dans les poumons à la fin d'une inspiration forcée |
| Capacité vitale | Volume maximal de gaz qui peut être expiré lors d'une expiration forcée suite à une inspiration maximale |
| Volume résiduel | Volume d'air restant dans les poumons à la fin d'une expiration forcée et qu'il n'est pas possible d'expulser |

Tableau 5 : Définition des volumes et capacités pulmonaires

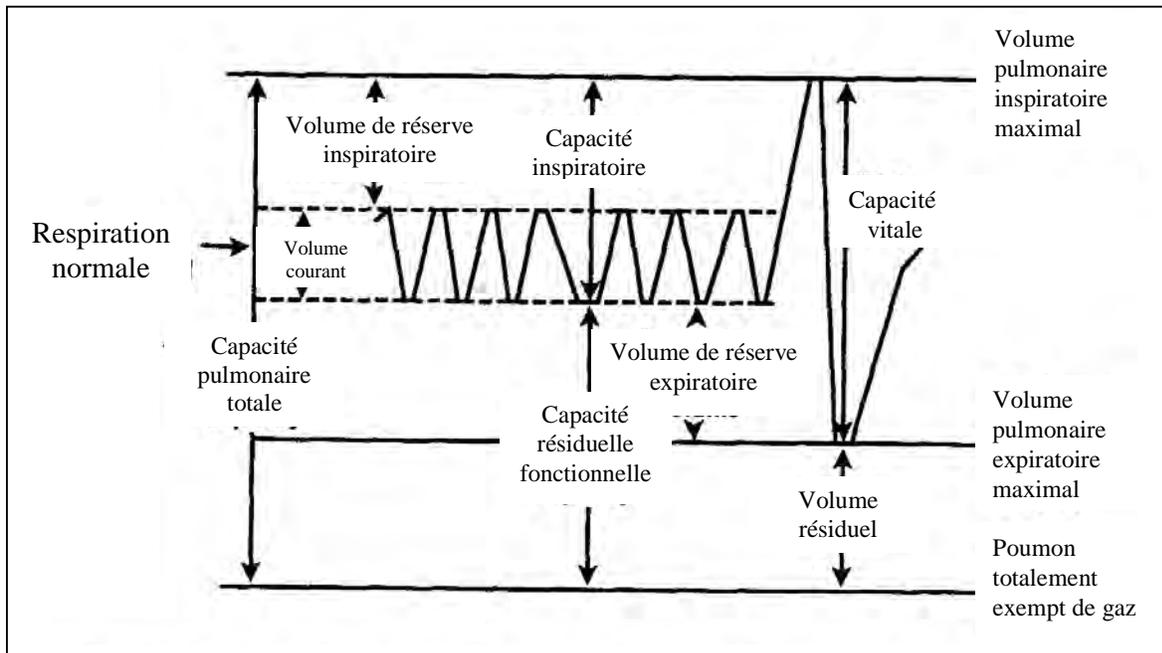


Figure 29 : Représentation schématique des volumes et capacités pulmonaires (147).

Le tableau 6 ci-dessous fournit des exemples de mesures de la fonction pulmonaire qui ont été utilisées pour l'évaluation des dommages causés par des toxiques aérogènes. Ces tests ont été décrits chez de nombreuses espèces dont le chien (172).

| Paramètre | Tests disponibles |
|--------------------------------------|---|
| Modèle ventilatoire | Fréquence respiratoire Volume courant Volume minute |
| Volumes pulmonaires statiques | Capacité vitale Capacité totale pulmonaire Volume résiduel Capacité fonctionnelle résiduelle Capacité inspiratoire Volume de réserve expiratoire |
| Mécanique respiratoire | Résistance à l'écoulement de l'air Compliance pulmonaire statique Compliance pulmonaire dynamique |
| Diffusion | Capacité de diffusion du monoxyde de carbone |
| Gaz sanguins | Mesures pH , pO ₂ et pCO ₂ artériels |
| Circulation pulmonaire | Détermination d'un oedème Pressions cardiovasculaires Volume cardiovasculaire, résistance au flux |

Tableau 6 : Différents tests de la fonction pulmonaire.

Lors de l'interprétation des données de la fonction pulmonaire, plusieurs points clés doivent être compris :

- Un effet fonctionnel spécifique n'est pas diagnostic d'un seul changement structural. Par exemple, une diminution de la capacité vitale ou de la compliance peut être causée par différents changements structuraux, incluant une fibrose, un oedème, une hémorragie ou une hyperplasie cellulaire.
- Le système respiratoire possède une importante réserve fonctionnelle. Par conséquent, une lésion pulmonaire relativement diffuse et étendue est nécessaire pour produire un effet détectable sur la fonction pulmonaire.
- Les lésions restrictives (par exemple, la fibrose) sont caractérisées par une diminution de l'élasticité des poumons, tandis que les lésions obstructives (par exemple, l'emphysème) sont caractérisées par des changements qui obstruent le mouvement de l'air dans les conduits aérifères.
- Les méthodes utilisées chez l'animal nécessitent souvent une anesthésie; une interférence potentielle avec les mesures doit donc être considérée.

La fréquence respiratoire constitue un indicateur sensible de l'irritation locale et est souvent corrélée à la concentration en toxique (cf 2ème partie, 3.2.4.). Comme nous l'avons déjà décrit, en fonction de la nature du toxique, la fréquence respiratoire peut être augmentée (par exemple, dans le cas du dioxyde d'azote ou de l'ozone) ou diminuée (cas du formol ou du dioxyde de soufre).

Des méthodes pléthysmographiques ont été utilisées pour mesurer la fréquence respiratoire, le volume courant, le volume minute et la capacité fonctionnelle résiduelle.

Les maladies pulmonaires restrictives et obstructives sont associées à une diminution sérieuse de l'écoulement de gaz dans la région pulmonaire d'échanges gazeux. Les tests de fonction pulmonaire sont utilisés pour distinguer ces deux maladies :

- ✓ Les lésions pulmonaires restrictives sont associées à une diminution de la capacité pulmonaire totale et de la capacité vitale; on observe chez l'animal une respiration rapide et superficielle.
- ✓ Les lésions obstructives provoquent une augmentation de la capacité pulmonaire totale, du volume résiduel et de la capacité fonctionnelle résiduelle; on observe chez l'animal une respiration lente et profonde.

De nombreux tests de la fonction pulmonaire nécessitent une collaboration active du sujet examiné, comme par exemple le FEV (volume expiratoire forcé). Ce test est souvent utilisé dans les études épidémiologiques ou dans les études cliniques contrôlées afin d'estimer les effets nocifs des polluants atmosphériques. Une diminution du FEV indique un affaiblissement de la ventilation associé à une maladie pulmonaire restrictive (augmentation de la rigidité pulmonaire) ou obstructive (écoulement de l'air obstrué). Chez le chien, la mesure du FEV ne peut se faire que sous anesthésie en appliquant une pression externe sur le thorax ou une pression négative dans les conduits aérifères.

Les propriétés mécaniques des poumons peuvent être testées en utilisant des tests statiques ou dynamiques :

- Les tests statiques peuvent être conduits sur l'animal vivant ou en utilisant des poumons excisés. Ils impliquent les informations dérivées des courbes pression-volume produites durant le dégonflement des poumons. L'analyse des courbes volume-pression au niveau pulmonaire fournissent des indications concernant la compliance statique pulmonaire. La compliance (volume/pression) réfère à la pente de la courbe volume-pression. Elle fournit des informations concernant les propriétés élastiques intrinsèques du parenchyme pulmonaire. La compliance diminue en cas de fibrose. De, même, une diminution de la compliance est observée avec des agents qui causent un oedème, une inflammation et une hyperplasie cellulaire.

La compliance augmente en cas d'emphysème du fait de la destruction du tissu conjonctif.

- Les test mécaniques dynamiques nécessitent un monitoring du débit, du volume et de la pression. Ils fournissent les mesures de la résistance pulmonaire et de la compliance dynamique qui sont sensibles à une obstruction aérienne périphérique.

La majeure partie de la résistance pulmonaire est représentée par la résistance des voies aériennes à l'écoulement des gaz.

L'efficacité respiratoire peut être estimée en mesurant les taux d'oxygène et de dioxyde de carbone dans le sang ou le taux de fixation sanguine du monoxyde de carbone (2) : ces tests concernant la capacité de diffusion constituent une composante importante de la batterie de tests de la fonction pulmonaire.

La mesure de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DL CO) nous renseigne sur l'efficacité des échanges gazeux alvéolaires (154).

Une diminution de la capacité de diffusion donc une altération des échanges gazeux peuvent être liées à des changements structuraux dans la région alvéolaire, comme un épaissement de la paroi alvéolaire (maladie restrictive/fibrose) ou une destruction de l'épithélium alvéolaire, à une diminution effective de la surface alvéolaire comme lors de maladie obstructive, à l'accumulation de fluides ou d'éléments cellulaires dans les alvéoles (oedème), à une ventilation insuffisante de la région alvéolaire (emphysème) ou à la présence insuffisante d'éléments de transport de l'oxygène (diminution du volume sanguin alvéolaire ou quantité réduite d'hémoglobine dans le sang).

Les échanges gazeux peuvent être évalués en mesurant la pression partielle artérielle de l'oxygène et du dioxyde de carbone.

L'inconvénient de ces tests de la fonction pulmonaire est que la manipulation, le stress et d'autres facteurs peuvent affecter les résultats. De même, il est à noter que l'utilisation de masques ou d'anesthésiques peuvent altérer le modèle respiratoire normal.

Enfin, il ne faut pas oublier que la mesure des volumes pulmonaires, des gaz sanguins et du pH sont importants dans la détermination des capacités fonctionnelles pulmonaires mais aussi de la dose réelle d'agent chimique reçu lors des essais toxicologiques.

3.2. LAVAGE PULMONAIRE(1, 29, 110)

Il s'agit d'un outil utile pour estimer les lésions pulmonaires et commode pour récupérer des macrophages et d'autres cellules pour une étude *in vitro*. Le lavage bronchoalvéolaire peut fournir des informations sur le type, le nombre et la morphologie des cellules ainsi que sur des constituants non-cellulaires, comme par exemple des teneurs en enzymes.

Le lavage bronchopulmonaire peut être utilisé pour évaluer la toxicité relative d'un ensemble de toxiques ou pour caractériser la réponse à un agent spécifique. Il peut également servir à suivre la progression d'une pathologie. Dans certains cas, il permet d'identifier l'étiologie d'un processus pathologique comme dans le cas de l'asbestose. En effet, les composés cellulaires, enzymatiques et solubles du fluide de lavage bronchoalvéolaire servent d'indicateurs de maladies pulmonaires. Dans beaucoup de cas, les constituants du fluide de lavage bronchopulmonaire corrélerent bien avec les changements morphologiques observés lors des autopsies.

Des solutions physiologiques salines peuvent être utilisées comme milieu de lavage. Le lavage bronchopulmonaire est réalisé en canulant la trachée ou une bronche sélectionnée et en instillant puis en retirant délicatement une solution physiologique saline de lavage. Les cellules sont retirées du fluide de lavage bronchoalvéolaire par centrifugation et le surnageant peut être analysé. Les analyses du fluide aspiré consistent à évaluer son profil cellulaire par comptage des cellules et son contenu protéique, lipidique ou enzymatique.

L'utilité de cette approche dépend de la corrélation entre les marqueurs biochimiques et l'apparition d'un dommage cellulaire ou tissulaire. Des marqueurs biochimiques indicateurs de dommages pulmonaires aigus ou chroniques sont facilement détectables dans les fluides de lavage bronchoalvéolaire. Malgré de nombreuses tentatives, il n'a pas été possible de détecter des marqueurs similaires dans le sérum.

Des lésions des cellules épithéliales peuvent entraîner la libération de composants cellulaires dans les sites endommagés du tractus respiratoire.

Par exemple, une augmentation de l'activité des enzymes marqueurs telles que la lactate déshydrogénase (109), la phosphatase alcaline ou les enzymes de conversion de l'angiotensine est en général un indicateur de dommages cellulaires dans les conduits aérifères ou le parenchyme pulmonaire.

Une augmentation de l'albumine sérique est un indicateur d'œdème pulmonaire.

La présence de certaines cellules inflammatoires et d'enzymes impliquées dans le métabolisme du collagène peuvent prédire le développement de modifications chroniques suite à des expositions à des poussières toxiques.

La teneur en collagène peut être estimée en déterminant l'hydroxyproline ou la prolylhydroxylase dans les tissus pulmonaires.

Les avantages du lavage bronchopulmonaire sont sa procédure relativement simple, la rapidité à laquelle les résultats peuvent être obtenus, la capacité d'étudier l'ensemble ou une partie des poumons et la possibilité de réaliser des évaluations séquentielles.

L'inconvénient est que seulement la surface des alvéoles et des conduits aérifères est échantillonné. Il s'agit tout de même d'une méthode utilisée couramment en toxicologie expérimentale.

4. ESTIMATION DU RISQUE A PARTIR DES ESSAIS TOXICOLOGIQUES

(18, 37, 131, 147, 164, 174)

L'estimation du risque se définit comme le procédé par lequel les données biologiques les plus pertinentes concernant l'identification du danger, l'exposition et la relation dose-réponse sont utilisées pour caractériser le risque.

L'évaluation du risque est une étape difficile dans le cas des intoxications par inhalation. En effet, il n'est pas évident de déterminer l'exposition de l'animal aux gaz, vapeurs ou aérosols toxiques.

Le risque d'intoxication résulte de la toxicité intrinsèque d'un composé pour un animal donné à un certain niveau d'exposition, soit :

$$\text{Risque} = \text{Toxicité intrinsèque} \times \text{Animal} \times \text{Exposition}$$

Cette information est utilisée pour produire une estimation qualitative et/ou quantitative d'un risque probable pour la santé humaine résultant de l'exposition à des agents chimiques aériens.

Le National Research Council sépare le procédé d'estimation du risque en quatre étapes :

- L'identification du risque,
- L'estimation de la dose-réponse,
- L'estimation de l'exposition et
- La caractérisation du risque.

Ce procédé, résumé dans la figure 30 située à la page suivante, est largement utilisé dans l'évaluation du risque des agents toxiques inhalés.

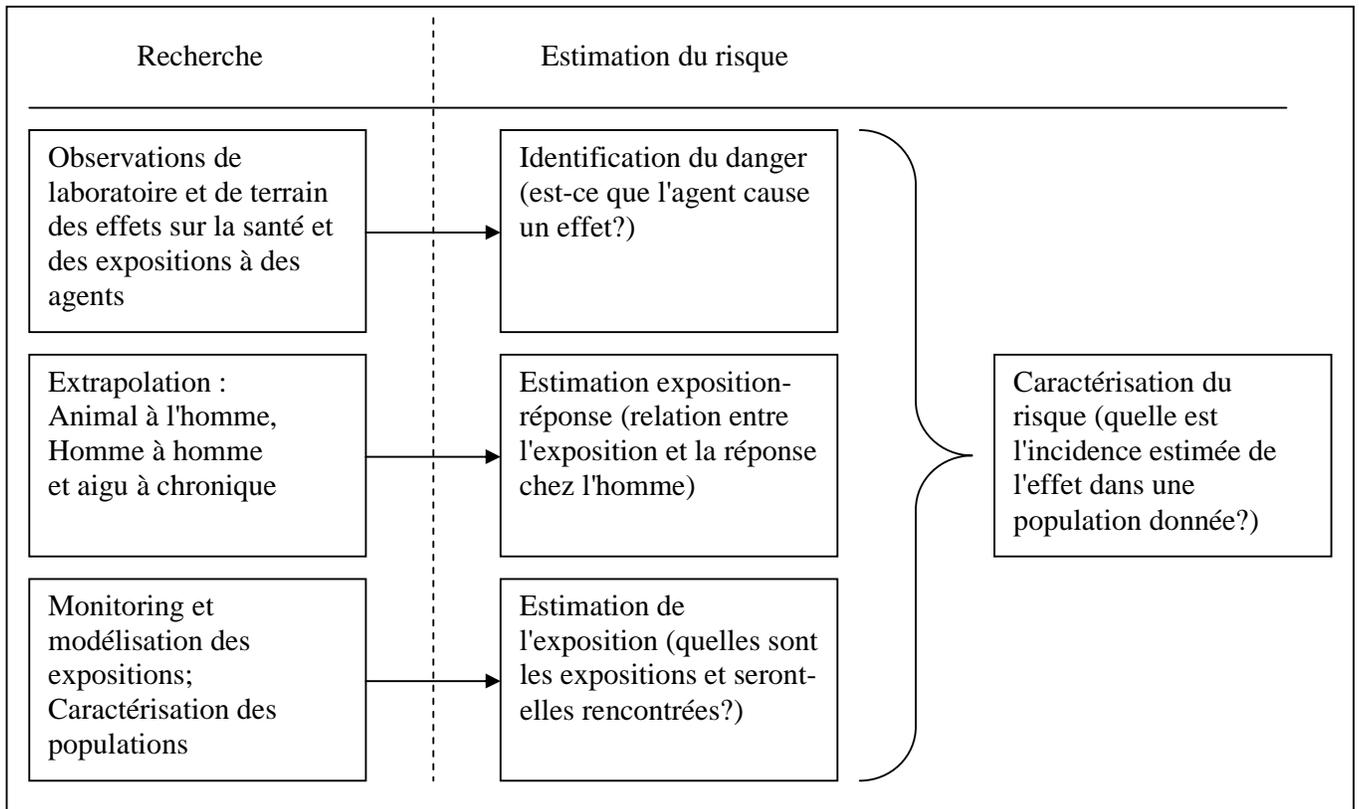


Figure 30 : Description schématique des différentes étapes de l'estimation du risque.

La question importante à se poser lors de l'estimation du risque n'est pas simplement ce qu'est la réponse toxique spécifique à un certain agent chimique, mais plutôt quel est le risque qu'un agent chimique produise des effets nocifs sur la santé sous des conditions d'exposition rencontrées chez l'homme.

Concernant les effets non cancérogènes, il est supposé que les effets délétères ne se produisent pas en-dessous d'un certain niveau d'exposition, même si l'exposition dure toute la vie. Cet effet seuil est appuyé par le fait que la toxicité de nombreux agents chimiques, incluant les substances aériennes, se manifestent seulement après l'épuisement d'une réserve physiologique et que les capacités biologiques de défense et de réparation de l'hôte peuvent s'accommoder d'un certain degré de dommage. Dans de tels cas, l'objectif de l'estimation du risque toxicologique est d'être capable d'établir, avec la meilleure certitude scientifique, une dose seuil en-dessous de laquelle les effets délétères pour la santé ne sont pas censés se produire.

Pour les effets cancérogènes, notamment ceux qui induisent des événements génotoxiques (mutations), un seuil peut ne pas exister. En effet, on considère que l'exposition à des cancérogènes pose un risque à toutes les doses et que la probabilité de développer un cancer augmente avec la dose.

Prédire le risque pour la santé humaine suite à l'exposition à des polluants aériens est complexe et nécessite des données fiables pour identifier le risque, une connaissance de la relation dose-réponse et une analyse de l'exposition humaine.

Il faut procéder à l'identification du polluant et de ses sources, du milieu environnemental d'exposition, des propriétés physico-chimiques de la substance aérienne et de l'intensité et de la fréquence de l'exposition.

La première étape dans l'estimation du risque est l'identification de potentiels effets délétères de la substance. L'analyse de l'estimation du risque la plus fiable devrait être basée sur des données toxicologiques collectées sous des conditions d'exposition qui soient réalistes et applicables aux expositions humaines, c'est-à-dire par la même voie d'exposition (l'inhalation), pour des durées similaires et avec des quantités qui reproduisent l'exposition humaine suspectée. Tous ces facteurs sont connus pour moduler la dose de polluant inhalé et/ou de ses métabolites et donc les effets toxicologiques résultant de cette exposition. En pratique courante, les scientifiques développent des modèles mathématiques qui permettent une extrapolation appropriée des études à haute dose à des études à faibles doses, des effets à court terme à des risques pour la santé durant toute la vie et qui ont la capacité de réaliser des extrapolations d'une voie d'entrée à l'autre ou d'une espèce à l'autre.

Développer des données fiables sur la relation dose-réponse à partir d'études par inhalation bien conduites est une étape essentielle dans le procédé général d'estimation du risque. Lors des expositions par inhalation, encore plus que pour les autres voies d'exposition, une attention toute particulière doit être accordée à la différence entre l'exposition et la dose. Lors de l'estimation des effets sur la santé, l'exposition est souvent utilisée comme un substitut de la dose. Dans ce cas, certains facteurs importants peuvent modifier significativement l'effet prédit (ces facteurs incluent les caractéristiques physico-chimiques du toxique, les mécanismes protecteurs, le métabolisme et les caractéristiques biologiques du sujet). Définir une dose appropriée résultant de certaines expositions devient une tâche difficile notamment quand l'étude implique un mélange complexe de toxiques aériens tels que les émissions automobiles, la fumée de cigarette ou les polluants atmosphériques.

L'étape finale, la caractérisation du risque, implique l'intégration et l'analyse des données existantes pour fournir une estimation numérique de l'incidence des effets nocifs dans une population donnée, lors de conditions d'expositions spécifiques.

Les méthodes existantes disponibles pour une caractérisation du risque ne sont pas encore idéales puisque chaque étape possède une incertitude associée due aux données limitées et à la connaissance incomplète du mécanisme d'action exact des toxiques chimiques dans le corps humain.

CONCLUSION

L'inhalation constitue l'une des principales voies d'entrée par laquelle un organisme peut être exposé à des substances toxiques. En raison notamment de l'industrialisation croissante, le nombre de ces agents toxiques ne cesse d'augmenter. Face à ce problème majeur de santé publique, une législation spécifique a été développée ces dernières années afin de protéger l'homme d'une exposition excessive que ce soit sur les lieux de travail ou dans l'environnement en général. Seules les données expérimentales issues des essais toxicologiques réalisés sur les animaux ont permis d'apporter des informations essentielles à la mise en place de ces réseaux de toxicovigilance.

De nombreuses espèces animales sont utilisées lors des études de toxicité par inhalation. Le chien est une espèce particulièrement intéressante. En effet, en tant qu'animal de compagnie, il côtoie le même environnement que l'homme. Il peut donc jouer le rôle d'animal sentinelle du risque pour l'homme.

Les essais toxicologiques par inhalation engendrent des coûts importants et sont très complexes d'un point de vue technique. Depuis quelques années, tout le monde s'accorde pour considérer qu'il convient d'une part de limiter au maximum l'expérimentation animale pour des raisons éthiques et économiques et d'autre part, de limiter au maximum la souffrance animale en choisissant des protocoles adéquats, d'où le développement de ce que l'on appelle les méthodes alternatives. Ce ne sont pas des méthodes capables de remplacer complètement l'expérimentation animale traditionnelle mais plutôt des méthodes complémentaires explicatives et mécanistiques qui permettent d'éviter certains essais *in vivo* et de donner à l'ensemble plus de cohérence. De nombreuses méthodes *in vitro* sont disponibles. Cependant, celles-ci ne peuvent reproduire la complexité des événements biologiques qui se produisent dans un être vivant lors d'une exposition à un toxique. A l'heure actuelle, aucune méthode *in vitro* de toxicité par inhalation n'est validée d'un point de vue réglementaire. Les essais toxicologiques réalisés sur les animaux sont donc indispensables.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ADAMS, G.K., AHARONSON, E.F., REASOR, M.J. et PROCTOR, D.F.- Collection of normal canine tracheobronchial secretions. *J. Appl. Physiol.*, 1976, **40**, 247.
- 2- ADARO, F., SCHEID, P., TEICHMANN, J. et PIIPER, J.- A rebreathing method for estimating pulmonary DO₂ : theory and measurement in dog lungs. *Respiration*, 1973, **18**, 43-63.
- 3- ADLER, K.B., WOOTEN, O. et DULFANO, M.J.- Mammalian respiratory mucociliary clearance. *Arch. Environ. Health*, 1973, **27**, 364-369.
- 4- ALARIE, Y.- Irritating properties of airborne materials to the upper respiratory tract. *Arch. Environ. Health*, 1966, **13**, 433-449.
- 5- ALARIE, Y.- Sensory irritation by airborne chemicals. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1973, **2**, 299-363.
- 6- ALARIE, Y.- Sensory irritation of the upper airways by airborne chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmac.*, 1973, **24**, 279-297.
- 7- ALARIE, Y.- Toxicological evaluation of airborne chemical irritants and allergens using respiratory reflex reactions. *In* : LEONG, B.K.J. (ed). *Inhalation Toxicology and Technology*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 1981, 207-231.
- 8- ALARIE, Y.- Bioassay for evaluating the potency of airborne sensory irritants and predicting acceptable levels of exposure in man. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 1981, **19**, 623-626.
- 9- ALLISON, A.C.- Effects of silica, asbestos, and other pollutants on macrophages. *In* : AHARONSON, E.R., BEN-DAVID, A. et KLINGBERG, M.A. (eds). *Air Pollution and the Lung*. New York : John Wiley, 1976, 114-134.
- 10- ALTMAN, P.L. et DITTMER, D.S.- *Biological Data Book*, Vol. III. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, MD, 1974.
- 11- AMDUR, M.O.- Sulfuric acid : The animals tried to tell us. Herbert Stokinger Lecture. *Appl. Ind. Hyg.*, 1989, **4**, 189-197.
- 12- ANDERSON, M.W. et ELING, T.E.- Studies on the uptake, metabolism, and release of endogenous and exogenous chemicals by the use of the isolated perfused lung. *Environ. Health Perspect.*, 1976, **16**, 77-81.
- 13- AUERBACH, D., HAMMOND, E.C., KIRMAN, D. et GARFINKEL, L.- Effects of cigarette smoking in dogs. *Arch. Environ. Health*, 1970, **21**, 754-768.
- 14- BAIR, W.J., PORTER, N.S., BROWN, D.P. et WEHNER, A.P.- Apparatus for direct inhalation of cigarette smoke by dogs. *J. Appl. Physiol.*, 1969, **26**, 847-850.
- 15- BARON, J., BURKE, J.P., GUENGERICH, F.P., JAKOBY, W.B. et VOIGT, J.M.- Site for xenobiotic activation and detoxification within the respiratory tract : Implications for chemically induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1988, **93**, 493-505.
- 16- BARONE, R.- Anatomie comparée des mammifères domestique, tome 3. Splanchnologie 1 : appareil digestif et appareil respiratoire. Paris : Vigot, 1997, 853 p.
- 17- BARROW, C.S.- *Toxicology of the Nasal Passages*. New York : Hemisphere, 1986.
- 18- BATES, D.V., DUNGWORTH, D.L., LEE, P.N., McCLELLAN, R.O. et ROE, F.J.C. (eds).- *Assessment of Inhalation Hazards*. New York : Springer-Verlag, 1989.

- 19- BATTISTA, S.P. et al.- Technique for implanting lower airway catheters chronically in dogs. *Arch. Environ. Health*, 1973, **27**, 333-339.
- 20- BERMAN, J.S., BEER, D.J., THEODOE, A.C., KORNFELD, H., BERNANDO, J. et CENTER, D.M.- Lymphocyte recruitment to the lung. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1990, **142**, 238-257.
- 21- BERNSTEIN, D.M. et DREW, R.T.- The major parameters affecting temperature inside inhalation chambers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1980, **41**, 420-426.
- 22- BIENENSTOCK, J., McDERMOTT, M.R. et BEFUS, A.D.- The significance of bronchus-associated lymphoid tissue. *Bulletin Européen de Physiopathologie Respiratoire*, 1982, **18**, 153-177.
- 23- BIENENSTOCK, J.- The lung as an immunologic organ. *Ann. Rev. Med.*, 1984, **35**, 49-62.
- 24- BOYD, M.R., STATHAM, C.N. et LONGO, N.S.- The pulmonary Clara Cell as a target for toxic chemicals requiring metabolic activation : Studies with carbon tetrachloride. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1980, **212**, 109-114.
- 25- BOYD, M.R.- Metabolic activation of pulmonary toxins. In : WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds). *Mechanisms in Respiratory Toxicology*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, **1**, 85-112.
- 26- BRAIN, J.D., KNUDSON, D.E., SOROKIN, S.P. et DAVIS, M.A.- Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ. Res.*, 1976, **11**, 13-33.
- 27- BRAIN, J.D., PROCTOR, D.F. et REID, L.M.- *Respiratory Defense Mechanisms*, Vols. I and II. New York : Elsevier, 1977.
- 28- BRAIN, J.D.- Macrophage damage in relation to the pathogenesis of lung diseases. *Environ. Health Perspect.*, 1980, **16**, 77-81.
- 29- BRAIN, J.D. et BECK, B.D.- Bronchoalveolar lavage. In : WITSCHI, H.P. et BRAIN, J.D. (eds). *Toxicology of Inhaled Materials*. New York : Springer-Verlag, 1985, 203-228.
- 30- BRAIN, J.D., BECK, B.D., WARREN, A.J. et SHAIKH, R.A. (eds)- *Variations in Susceptibility to Inhaled Pollutants*. Baltimore : The Johns Hopkins University Press, 1988.
- 31- BRASHEAR, R.E., ROSS, J.C. et DALY, W.J.- Pulmonary diffusion and capillary blood volume in dogs at rest and with exercise. *J. Appl. Physiol.*, 1966, **21**(2), 516-520.
- 32- BREEZE, R.G. et CARLSON, J.R.- Chemical-induced lung injury in domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 1982, **226**, 201-231.
- 33- BRODEUR, J. et TARDIF, R.- Absorption. In : WEXLER, P. (ed). *Encyclopedia of Toxicology*. San Diego : Academic Press. 1998, **1**, 5-7.
- 34- BROWN, S.S. et DAVIES, D.S.- *Organ-directed Toxicity : Chemical Indices and Mechanisms*. New York : Pergamon Press, 1981.
- 35- BUCKLEY, L.A., JIANG, X.Z., MORGAN, K.T. et BARROW, C.S.- Respiratory tract lesions induced by sensory irritants at the RD50 concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1984, **74**, 417-429.
- 36- BUKOWSKI, J.A., WARTENBERG, D. et GOLDSCHMIDT, M.- Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1998, **54**(7), 579-591.
- 37- CALABRESE, E.J. et KENYON, E.M.- *Air Toxic and Risk Assessment*. MI : Lewis, Chelsea, 1991.
- 38- CAMPDELL, E.J., SENIOR, R.M. et WELGUS, H.G.- Extracellular matrix injury during lung inflammation. *Chest*, 1987, **92**, 161-167.
- 39- CANTOR, J.O. (ed)- *Handbook of Animal Models of Pulmonary Disease*. Vol. I et II. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1989.
- 40- CARSON, R.- *Silent Spring*. New York : Mariner Books, 2002, 400 p.

- 41- CASARETT, L.J. et MILLEY, P.S.- Alveolar reactivity following inhalation of particles. *Health Phys.*, 1964, **10**, 1003-1011.
- 42- CASARETT, L.J.- Toxicology - The respiratory tract. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 1971, **11**, 425-446.
- 43- CASARETT, L.J.- The vital sacs : Alveolar clearance mechanisms in inhalation toxicology. In : HAYES, W.J. (ed). *Essays in Toxicology*. New York : Academic Press, 1972, **3**, 1-36.
- 44- CASARETT, L.J.- Toxicology of the respiratory system. In: CASARETT, L.J. et DOULL, J. (eds). *Toxicology - the Basic Science of Poisons*. 5e Edition. New York : Macmillan, 1996, 361-380.
- 45- CASTLEMAN, W.L. - Spontaneous pulmonary infections in animals affecting studies on comparative lung morphology and function. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1983, **128**, S83-S87.
- 46- CASTRANOVA, V., RABOVSKY, J., TUCKER, J.H. et MILES, P.R.- The alveolar type II epithelial cell : A multifunctional pneumonocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1988, **93**, 472-483.
- 47- CHENG, Y.S. et MOSS, O.R.- Inhalation exposure systems. In : McCLELLAN, R.O. et HENDERSON, R.F. (eds). *Concepts in Inhalation Toxicology*. New York : Hemisphere Publishing Corporation, 1989, 19-56.
- 48- CIVIL, G.W. et HEPPELSTON, A.G.- Replenishment of alveolar macrophages in silicosis: Implication of recruitment by lipid feed-back. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1979, **60**, 537-547.
- 49- CLARK, D.G.- Long term inhalation studies. In : BALLANTYNE, B. (ed). *Current Approaches in Toxicology*. Bristol : John Wright, 1977, 105-114.
- 50- CLARK, D.G., BUCH, S., DOE, E., FRITH, H. et PULLINGER, D.H.- Bronchopulmonary function : report of the main working party. *Pharmac. Ther.*, 1979, **5**, 149-179.
- 51- CLARK, D.G.- Inhalation Toxicity. In : BALLS, M., RIDELL, R.J. et WORDEN, A.N. (eds). *Animals and Alternatives in Toxicity Testing*. London : Academic Press, 1983, 299-312.
- 52- COBB, L.M.- Pulmonary toxicity. In : GORROD, J. (ed). *Testing for Toxicity*. London : Taylor & Francis, 1981.
- 53- COBURN, R.F.- Mechanisms of carbon monoxide toxicity. *Prev. Med.*, 1979, **8**, 310-322.
- 54- CONNELLY, J.C. et BRIDGES, J.W.- Species variation in target organ toxicity. In : COHEN, G.M. (ed). *Target Organ Toxicity*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1986, **1**, 89-117.
- 55- CONROE, J.H., FORSTER, R.E., DUBOIS, A.B. et al.- *The Lung*. 2e Edition. Chicago : Year Book Medical, 1973.
- 56- COOPER, J.A.D., WHITE, D.A. et MATTHAY, R.A.- Drug induced pulmonary disease. Part I. Cytotoxic drugs. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1986a, **133**, 321-340.
- 57- COOPER, J.A.D., WHITE, D.A. et MATTHAY, R.A.- Drug induced pulmonary disease. Part II. Noncytotoxic drugs. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1986b, **133**, 488-505.
- 58- CRAPO, J., MILLER, F.J., MOSSMAN, B., PRYOR, W.A. et KILEY, J.P.- Relationship between acute inflammatory responses to air pollution and chronic lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, **145**, 1506-1512.
- 59- CROSS, C.E., PARSONS, G.H., GORIN, A.B. et LAST, J.A.- Pulmonary edema : Emphasis of physiologic and toxicological considerations. In : WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds). *Mechanisms in Respiratory Toxicology*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, **1**, 219-246.
- 60- DADOUNE, J.P.- *Histologie*. Paris : Flammarion, 1990.

- 61- DAHL, A.R.- Possible consequences of cytochrome P-450 dependent monooxygenases in nasal tissues. In : BARROW, C.S. (ed). Toxicology of the Nasal Passages. New York : Hemisphere, 1986, 263-273.
- 62- DAHL, A.R. et LEWIS, J.L.- Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, **32**, 383-407.
- 63- DAVIES, P., ALLISON, A., ACKERMAN, J. et al.- Asbestos induces selective release of lysosomal enzymes from mononuclear phagocytes. *Nature*, 1974, **251**, 423-425.
- 64- DAWSON, C.A. et LINEHAM, J.H.- Biogenic amines. In : MASSARO, D. (ed). Lung Cell Biology. New York : Marcel Dekker, 1989, 1091-1139.
- 65- DERRICK, M.J. et BENFIELD, J.R.- Lung cancer models in animals. In : CANTOR, J.O. (ed). Handbook of Animal Models of Pulmonary Disease. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1989, **2**, 171-205.
- 66- DEVEREUX, T.R., DOMIN, B.A. et PHILPOT, R.M.- Xenobiotic metabolism by isolated pulmonary cells. *Pharmacol. Ther.*, 1989, **41**, 243-256.
- 67- DOE, J.E. et TINSTON, D.- Novel chambers for long term inhalation studies. In : LEONG, B.K.J. (ed). Inhalation Toxicology and Technology. Ann Arbor, Michigan : Ann Arbor Science Publishers, 1981, 77-88.
- 68- DRAZEN, J.M.- Physiological basis and interpretation of indices of pulmonary mechanics. *Environ. Health Perspect.*, 1984, **55**, 3-9.
- 69- DRAZEN, J.M. et AUSTEN, K.F.- Leukotrienes and airway responses. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1987, **136**, 985-998.
- 70- DREW, R.T.- Design of inhalation exposure systems. Society of Toxicology Refresher Course, 24th Annual Meeting, San Diego, CA, 1985.
- 71- DREW, R.T.- Inhalation toxicology- A status report. *Appl. Ind. Hyg.*, 1987, **2**, 213-217.
- 72- DUBIN, E.D. et MORRISSON, G.- A face mask and mouthpiece for respiratory studies in unanaesthetised beagle dogs. *J. Appl. Physiol.*, 1969, **27**, 104-105.
- 73- DUBOIS, A.B. et ROGERS, R.M.- Respiratory factors determining the tissue concentrations of inhaled toxic substances. *Resp. Physiol.*, 1968, **5**, 34.
- 74- DUNGWORTH, D.L. (ed)- The respiratory system. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 1982, **26**, New York : Academic Press,.
- 75- DUNGWORTH, D.L.- Interstitial pulmonary disease. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 1982, **26**, 173-200.
- 76- EVANS, M.J.- Cell death and cell renewal in small airways and alveoli. In : WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds). Mechanisms in Respiratory Toxicology. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, **1**, 189-218.
- 77- FANTONE, J.C., FELTNER, D.E., BRIELAND, J.K. et WARD, P.A.- Phagocytic cell-derived inflammatory mediators and lung disease. *Chest*, 1987, **91**, 428-435.
- 78- FARRELL, P.M. (ed)- Lung Development : Biological and Clinical Perspectives, Vol. I, Biochemistry and Physiology. New York : Academic Press, 1982.
- 79- FERIN, J., URBANKOVA, G. et VLCKOVA, A.- Pulmonary clearance and the function of macrophages. *Arch. Environ. Health.*, 1965, **10**, 790-795.
- 80- FERON, V.J., WOUTERSEN, R.A., et SPIT, B.J.- Pathology of chronic nasal toxic responses including cancer. In : BARROW, C.S. (ed). Toxicology of Nasal Passages. New York : Hemisphere, 1986, 67-90.
- 81- FINKELSTEIN, J.N.- Isolation and culture of type II alveolar epithelial cells. In : TYSON, C.A. et FRAZIER, J.M. (eds). *In Vitro* Biological Systems: Methods in Toxicology. San Diego : Academic Press, 1993, **1**, 110-122.
- 82- FISEROVA-BERGOROVA, V. (ed)- Modelling of Inhalation Exposure to Vapours : Uptake, Distribution and Elimination, Vols. I et II. Boca Raton, FL : CRC Press, 1983.

- 83- FISHER, A.B.- The isolated perfused lung. In : WITSCHI, H.P. et BRAIN, J.D. (eds). Toxicology of Inhaled Materials. New York : Springer-Verlag, 1985, 149-180.
- 84- FISHER, G.L. et PLACKE, M.E.- *In vitro* models of lung toxicity. *Toxicology*, 1987, **47**, 71-93.
- 85- FORSTER, R.E.- Exchange of gases between alveolar air and pulmonary capillary blood : pulmonary diffusing capacity. *Physiol. Rev.*, 1957, **37**(4), 391-452.
- 86- FRASER, D.A., BALES, R.E., LIPPMANN, M. et STOCKINGER, H.E.- Exposure chambers for research in animal inhalation. Public Health Monograph 357, Washington, D.C. : U.S. Government Printing Office, 1959.
- 87- GAD, S.C. et CHENGELIS, C.P.- Acute Toxicology : Principles and Methods. Telford, Caldwell, NJ, 1981.
- 88- GAD, S.C.- Toxicity Testing, Inhalation. In : WEXLER, P. (ed). Encyclopedia of Toxicology. San Diego : Academic Press. 1998, **3**, 319-328.
- 89- GAIL, D.B. et LENFANT, C.J.M.- Cells of the lung : Biology and clinical implications. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1983, **127**, 366-387.
- 90- GARDNER, D.E.- Alterations in macrophage functions by environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.*, 1984, **55**, 343-358.
- 91- GARDNER, D.E., CRAPO, J.D. et McCLELLAN, R.O. (eds)- Toxicology of the lung. New York : Raven Press, 1993.
- 92- GARDNER, D.E. et KIRKPATRICK, D.T.- Respiratory Tract. In : WEXLER, P. (ed). Encyclopedia of Toxicology. San Diego : Academic Press. 1998, **3**, 52-86.
- 93- GIL, J.- Comparative morphology and structure of the airways. In : WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds). Mechanisms in Respiratory Toxicology. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, **1**, 3-26.
- 94- GLICKMAN, L.T., DOMANSKI, L.M., MAGUIRE, T.G., DUBIELZIG, R.R. et CHURG, A.- Mesothelioma In Pet Dogs Associated With Exposure Of Their Owners To Asbestos. *Environmental Research*, 1983, **32**(2), 305-313.
- 95- HAAB, P., DUE, G., STUCKI, R. et PIIPER, J.- Echanges gazeux en hypoxie et la capacité de diffusion pour l'oxygène chez le chien narcotisé. *Physiol. Acta.*, 1964, **22**, 203-207.
- 96- HAAGSMAN, H.P. et VAN GOLDE, L.M.G.- Lung surfactant and pulmonary toxicology. *Lung*, 1985, **163**, 275-303.
- 97- HABER, F.R.- *Fünf Vorträge aus den Jahren 1920-1924*. Berlin : Springer-Verlag, 1924.
- 98- HADLEY, W.H. et DAHL, A.R.- Cytochrome P-450 dependent monooxygenase activity in nasal membranes of six species. *Drug Metab. Dispos.*, 1983, **11**, 275-276.
- 99- HAKKINEN, P.J. et WITSCHI, H.P.- Animal models. In : WITSCHI, H.P. et BRAIN, J.D. (eds). Toxicology of Inhaled Materials. New York : Springer-Verlag, 1985, 95-107.
- 100- HAMMOND, P.B.- The use of animals in toxicological research. National Library of Medicine, Bethesda, MD, 1970.
- 101- HASCHEK, W.M. et WITSCHI, H.P.- Pulmonary fibrosis- A possible mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1979, **51**, 475-487.
- 102- HASCHEK, W.M., BRODY, A.R., KLEIN-SZANTO, A.J.P. et WITSCHI, H.P.- Animal model of human disease. Diffuse interstitial pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 1981, **150**, 333-335.
- 103- HASCHEK, W.W. et WITSCHI, H.P.- Respiratory system, In : HASCHEK, W.M. et ROUSSEAU, C.G. (eds). Handbook of Toxic Pathology. San Diego : Academic Press, 1991, 761-828.
- 104- HATCH, T.F.- Respiratory dust retention and elimination. In : ORENSTEIN, A.J. (ed). Proceedings of the Pneumoconiosis Conference. London : Churchill, 1960.

- 105- HATCH, T.F. et GROSS, P.- Pulmonary deposition and retention of inhaled particles. New York : Academic Press, 1964.
- 106- HAYES, J.A.- Inhalational Toxicology. In : MARQUIS, J.K. (ed). A guide to general Toxicology. London : Karger, 1989, 123-140.
- 107- HAYES, A.W. (ed)- Principles and Methods of Toxicology, 2e Edition, New York : Raven Press, 1989, 361-382.
- 108- HEMENWAY, D.R. et *al.*- Inhalation toxicology chamber performance : a quantitative model. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1982, **43**, 120-127.
- 109- HENDERSON, R.F., DAMON, E.G. et HENDERSON, T.R.- Early damage indicators in the lungs. I. Lactate dehydrogenase activity in the airways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1978, **44**, 291-297.
- 110- HENDERSON, R.F., BENSON, J.M., HAHN, F.F., HOBBS, C.H., JONES, R.K., MAUDERLY, J.L., McCLELLAN, R.O. et PICKRELL, J.A.- New approaches for the evaluation of pulmonary toxicity : Bronchoalveolar lavage fluid analysis. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1985, **5**, 451-458.
- 111- HEXT, P.M., GASKELL, B.A., LOCK, E.A. et PIGOTT, G.H.- Species differences in the toxicity and metabolism of 3-trifluoromethylpyridine in olfactory tissue. *Inhal. Toxicol.*, 1994, **6** (Suppl.), 366-368.
- 112- HEXT, P.M.- Inhalation Toxicology. In : BALLANTYNE, B., MARRS, T. et SYVERSEN, T. (eds). General and Applied Toxicology. 2e Edition. London : Macmillan, 1999, **1**, 587-601.
- 113- HIDY, G.M.- Aerosols- An Industrial and Environmental Science. Orlando, FL : Academic Press, 1984.
- 114- HINDS, W.C.- Aerosol Technology- Properties, Behavior and Measurement of Airborne Particles. New York : Wiley, 1982.
- 115- HINNERS, R.G. et *al.*- Animal inhalation exposure chambers. *Arch. Environ. Health*, 1986, **16**, 194-206.
- 116- HOOK, G.- Monograph on pulmonary toxicology. *Environ. Health Perspect.*, 1984, **55**, 1-416.
- 117- HOOK, G.E.R., GILMORE, L.B., GUPTA, R.P., PATTON, S.E., JETTEN, A.M. et NETTESHEIM, P.- The function of pulmonary Clara cells. In : THOMASSON, D.G. et NETTESHEIM, P. (eds). Biology, Toxicology and Carcinogenicity of Respiratory Epithelium. New York : Hemisphere, 1990, 38-59.
- 118- HOUMAN, R.F. et SHERWOOD, R.J.- The cascade centripeter: a device for determining the concentration and size distribution of aerosols. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1965, **26**, 122-131.
- 119- HUMPHREY, E.W., EWING, S.L., WRIGLEY, J.V. et *al.*- The production of malignant tumors of the lung and pleura in dogs from intratracheal asbestos instillation and cigarette smoking. *Cancer*, 1981, **47**(8), 1994-1999.
- 120- HUMPHREYS, D.J.- Veterinary Toxicology. 3e Edition. London : Baillière Tindall, 1988, 81-85.
- 121- IRISH, D.D. et ADAMS, E.M.- Apparatus and methods for testing the toxicity of vapors. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Q.*, 1940, **1**, 1-5.
- 122- JANOFF, A.- Elastases and emphysema. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1985, **132**, 417-433.
- 123- JENNER, J. et DODD, G.H.- Xenobiotic metabolism in the nasal epithelia. *Drug Metab. Drug Interact.*, 1988, **6**, 123-148.
- 124- JIAN, X.Z., MORGAN, K.T. et BEAUCHAMP, R.O.- Histopathology of acute and subacute nasal toxicity. In : BARROW, C.S. (ed). Toxicology of Nasal Passages. New York : Hemisphere, 1986, 51-66.

- 125- JUNOD, A.F. et DE HALLER, R.- Lung Metabolism. London : Academic Press, 1975. 501 p.
- 126- KANG, K.Y. et SALVAGGIO, J.- Effects of asbestos and beryllium compounds on the alveolar macrophages. *Med. J. Osaka Univ.*, 1976, **27**, 47-52.
- 127- KAROL, M.H., STADLER, J. et MAGRENI, C.- Immunotoxicologic evaluation of the respiratory system : Animal models for immediate- and delayed-onset pulmonary hypersensitivity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1985, **5**, 459-472.
- 128- KAROL, M.H. et THORNE, P.S.- Pulmonary hypersensitivity and hyperreactivity: Implications for assessing allergic responses. *In* : GARDNER, D.E., CRAPO, J.D. et MASSARO, E.J. (eds). *Toxicology of the lung*. New York : Raven Press, 1988, 427-448.
- 129- KATSNELSON, B.A. et PRIVALOVA, L.I.- Recruitment of phagocytosing cells into the respiratory tract as a response to the cytotoxic action of deposited particulates. *Environ. Health Perspect.*, 1984, **55**, 313-325.
- 130- KEHRER, J.P. et KACEW, S.- Systematically applied chemicals that damage lung tissue. *Toxicology*, 1985, **35**, 251-293.
- 131- KENNEDY, G.L., Jr.- Techniques for evaluating hazards of inhaled products. *In* : GAD, S.C. (ed). *Product Safety Evaluation Handbook*. New York : Marcel Dekker, 1988, 259-290.
- 132- KENNEDY, G.L.- Inhalation Toxicology. *In* : HAYES, A.W. (ed). *Principles and Methods of Toxicology*. 2e Edition. New York : Raven Press, 1989, 361-382.
- 133- KENSLER, C.J. et BATTISTA, S.P.- Chemical and physical factors affecting mammalian ciliary activity. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1966, **93**(3), 93-102.
- 134- KRELL, R.D. et SNYDER, D.W.- Pulmonary physiology, pharmacology, and biochemistry of the leukotrienes. *In* : HOLLINGER, M.A. (ed). *Current Topics in Pulmonary Pharmacology and Toxicology*. New York : Elsevier, 1987, **3**, 174-209.
- 135- KUHN, C., SENIOR, R.M. et PIERCE, J.A.- The pathogenesis of emphysema. *In* : WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds). *Mechanisms in Respiratory Toxicology*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, **2**, 155-211.
- 136- LABELLE, C.W. et BRIEGER, H.- Fate of inhaled particles in early post exposure period : II. Role of pulmonary phagocytosis. *Arch. Environ. Health.*, 1960, **1**, 423-427.
- 137- LABELLE, C.W. et BRIEGER, H.- Basic physiologic mechanisms in the pulmonary response to the inhaled particulates. *Proc. Int. Congr. Occup. Health.*, 13th, 1960, 730-735.
- 138- LAST, J.A. et KAIZER, T.- Mucus glycoprotein secretion by tracheal explants : Effects of pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 1980, **35**, 131-137.
- 139- LAST, J.A.- Changes in the collagen pathway in fibrosis. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1985, **5**, 210-218.
- 140- LEACH, L.J., SPIEGL, C.J., WILSON, R.H. et al.- A multiple chamber exposure unit designed for chronic inhalation studies. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1959, **20**, 13-22.
- 141- LEACH, L.J., MAYNARD, E.A., HODGE, H.C. et al.- A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. I. Retention and biological effects in the monkey, dog, and rat. *Health Phys.*, 1970, **18**, 599-612.
- 142- LEONG, B.K.J.- Proceedings of the Inhalation Toxicology and Technology Symposium. Kalamazoo, Michigan : Ann Arbor Scientific Publishers, 1980.
- 143- LEWIS, T.R., MORROW, P.E., McCLELLAN, R.O. et al.- Establishing aerosol exposure concentrations for inhalation toxicity studies. *Fund. Appl. Toxicol.*, 1988 (in press).
- 144- LIPPMANN, M. et ALBERT, R.E.- The effect of particle size on the regional deposition of inhaled aerosols in the human respiratory tract. *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1969, **30**, 257-275.
- 145- LOOMIS, T.A.- Essentials of Toxicology. 2e Edition. Philadelphia : Lea & Febiger. 1974, 66-69.

- 146- MACCLELLAN, R.O.- Health effects of diesel exhaust- A case study in risk assessment. *Am. Gov. Ind. Hyg.*, 1985, **13**, 3-12.
- 147- MACCLELLAN, R.O. et HENDERSON, R.F. (eds)- Concepts in Inhalation Toxicology. New York : Hemisphere, 1989.
- 148- MACFARLAND, H.N.- Respiratory toxicology. In : HAYES, W.J. (ed). Essays in Toxicology. New York : Academic Press, 1976, **7**, p 136.
- 149- MACFARLAND, H.N.- A problem and a non-problem in chamber inhalation studies. In : LEONG, B.K.J. (ed). Inhalation Toxicology and Technology. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, 1981, 11-18.
- 150- MACFARLAND, H.N.- Designs and operational characteristics of inhalation exposure equipment- A review. *Fund. Appl. Toxicol.*, 1983, **3**, 603-613.
- 151- MACLAUGHLIN, R.F., Jr., TYLER, W.S. et CANADA, R.O.- A study of the subgross pulmonary anatomy in various mammals. *Am. J. Anat.*, 1961, **108**, 149-166.
- 152- MAGILL, P.L., HOLDEN, F.R., ACKLEY, C.- Air pollution handbook. New York : McGraw-Hill, 1956.
- 153- MALKINSON, A.M., MILEY, F.B., CHICHESTER, C.H. et PLOPPER, C.G.- Isolation of nonciliated bronchiolar (Clara) epithelial cells from mouse lung. In : TYSON, C.A. et FRAZIER, J.M. (eds). *In Vitro Biological Systems: Methods in Toxicology*. San Diego : Academic Press, 1993, **1**, 123-133.
- 154- MAUDERLEY, J.L.- Steady state carbon monoxide diffusing capacity of unanaesthetized beagle dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1972, **33**, 1485-1491.
- 155- MAUDERLEY, J.L.- Influence of sex and age on the pulmonary function of the unanaesthetized beagle dog. *J. Gerontol.*, 1974, **29**(3), 282-289.
- 156- MAUDERLEY, J.L.- Effects of inhaled toxicants on pulmonary function, In : McCLELLAN, R.O. et HENDERSON, R.F. (eds). Concepts in Inhalation Toxicology. New York : Hemisphere, 1989, 347-402.
- 157- MENZEL, D.B. et McCLELLAN, R.O.- Toxic response of the respiratory system. In : DOULL, J., KLAASEN, C.D. et AMDUR, M.O (eds). Casarett and Doull's Toxicology, New York : Macmillan, 1980, 240-274..
- 158- MERCER, T.T., MORROW, P.E. et STÖBER, W.- Assessment of airborne particles. Thomas, Springfield, 1972.
- 159- MERCHANT, J.A., (ed)- Occupational Respiratory Diseases. DHHS (NIOSH) Publ. No. 86-102. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C., 1986.
- 160- MILLER, M.E.- Anatomy of the Dog. Philadelphia : Saunders, 1964.
- 161- MILLER, R.R., LETTS, R.L., POTTS, W.J. et McKENNA, M.J.- Improved methodology for generating controlled test atmospheres. *Am. J. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1988, **41**, 844-846.
- 162- MINCHIN, R.F. et BOYD, M.R.- Localization of metabolic activation and deactivation systems in the lung : Significance to the pulmonary toxicity of xenobiotics. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1983, **23**, 217-238.
- 163- MITCHELL, R.I.- Retention of aerosol particles in the respiratory tract : A review. *Annu. Rev. Resp. Dis.*, 1960, **82**, 627-639.
- 164- MOHR, U. (ed)- Inhalation Toxicology, the Design and Interpretation of Inhalation Studies and their Use in Risk Assessment. New York : Springer, 1989.
- 165- MOORES, S.R., BLACK, A., EVANS, J.C. et *al.*- The short-term cellular and biochemical response of the lung to toxic dusts: An *in vivo* cytotoxicity test. In : BROWN, R.C., GORMLEY, I.P, CHAMBERLAIN, M. et DAVIES, R. (eds). The *In Vitro* Effects of Mineral Dusts. New York : Academic Press, 1981, 297-303.
- 166- MORROW, P.E.- Some physical and physiological factors controlling the fate of inhaled substances. I. Deposition. *Health Phys.*, 1960, **2**, 366-378.

- 167- MORROW, P.E.- Animals in toxic environments : Mammals in poluted air. In : Handbook of Physiology. *Amer. Physiol. Soc.*, Washington, D.C, 1964.
- 168- MORROW, P.E., GIBB, F.R. et JOHNSON, L.- Clearance of insoluble dust from the lower respiratory tract. *Health Phys.*, 1964, **10**, 543-555.
- 169- MORROW, P.E.- Models for the study of particle retention and elimination in the lung. In : HANNA, M.G., NETTESHEIM, P. et GILBERT, J.R. (eds). Inhalation Carcinogenesis, (CONF-691001). U. S. Atomic Energy Commission, Division of Technical Information, Oak Ridge, TN, 1970, 103-115.
- 170- MORROW, P.E.- Alveolar clearance of aerosols. *Arch. Int. Med.*, 1973, **131**, 101-108.
- 171- MOULTON, J.E.- Tumors of the respiratory system. In : MOULTON, J.E. (ed). Tumors in Domestic Animals. Los Angeles : University of California Press, 1990, 308-346.
- 172- MUGGENBURG, B.A. et MAUDERLEY, J.L.- Cardiopulmonary function of awake, sedated, and anesthetized beagle dogs. *J. Appl. Physiol.*, 1974, **37**, 152-162.
- 173- MUSTAFA, M.G.- General enzymology of the lung. In : WITSCHI, H.P. et BRAIN, J.D. (eds). Toxicology of Inhaled Materials. New York : Springer-Verlag, 1985, 369-420.
- 174- National Research Council- Human Exposure Assessment for Airborne Pollutants: Advances and Opportunities. Washington, D.C. : National Academy of Science, 1991.
- 175- NETTESHEIM, P. et GRIESEMER, R.A.- Experimental models for studies of respiratory tract carcinogenesis, In : HARRIS, C.C. (ed). Pathogenesis and Therapy of Lung Cancer. New York : Marcel Dekker, 1978, 75-188.
- 176- NETTESHEIM, P. (ed). Mechanisms in Respiratory Toxicology. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, **1**, 219-246.
- 177- NIDEN, A.H., MITTMAN, C. et BURROWS, B.- Pulmonary diffusion in the dog lung. *J. Appl. Physiol.*, 1962, **17**, 885-892.
- 178- NIELSEN, G.D. et ALARIE, Y.- Animal assays for upper airway irritation : Screening of materials and structure-activity relations. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1991, **641**, 164-175.
- 179- NIEWOEHNER, D.E. et HOIDAL, J.R.- Lung fibrosis and emphysema : Divergent responses to a common injury. *Science*, 1982, **217**, 359-360.
- 180- NUNN, J.F.- Nunn's Applied Respiratory Physiology, 4e Edition. London : Butterworth-Heinemann, 1993.
- 181- O'NEIL, J.J. et YOUNG, S.L.- Tissue slices in the study of lung metabolism. In : FARELL, P.M. (ed). Lung Development : Biological and Clinical Perspectives. Biochemistry and Physiology. New York : Academic Press, 1982, **1**, 87-99.
- 182- PARENT, R.A.: Treatise on Pulmonary Toxicology, vol. I : Comparative Biology of the Normal Lung. Boca Raton, FL : CRC Press, 1991.
- 183- PAULUHN, J.- Overview of testing methods in inhalation toxicity : from facts to artifacts. *Toxicology Letters*, 2002, **140**, 183-193.
- 184- PHALEN, R.F.- Inhalation exposure of animals. *Environ. Health Perspect.*, 1976, **16**, 17-24.
- 185- PHALEN, R.F.- Inhalation Studies : Foundation and Techniques. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1984, 211-241.
- 186- PHALEN, R.F., MANNIX, R.C. et DREW, R.T.- Inhalation exposure methodology. *Environ. Health Perspect.*, 1984, **56**, 23-34.
- 187- PHALEN, R.F.- Morphology of the respiratory tract. In : Concepts in inhalation toxicology, 2e Edition. 1995.
- 188- PHALEN, R.F.- Methods in Inhalation Toxicology. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1996.
- 189- PICKRELL, J.A.- Lung Connective Tissue : Location, Metabolism, and Response to Injury. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1981.

- 190- PLACKE, M.E. et FISHER, C.E.- Adult peripheral lung organ culture- a model for respiratory tract toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1987, **90**, 284-298.
- 191- PLOPPER, C.G., MARIASSAY, A.T. et HILL, L.H.- Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. II. A comparison of horse, steer, sheep, dog, and cat. *Exp. Lung Res.*, 1980a, **1**, 155-169.
- 192- PLOPPER, C.G., HILL, L.H. et MARIASSAY, A.T.- Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. III. A study of man with comparison of 15 mammalian species. *Exp. Lung Res.*, 1980b, **1**, 171-180.
- 193- PLOPPER, C.G., CHANG, A.M., PANG, A. et BUCKPITT, A.R.- Use of microdissected airways to define metabolism and cytotoxicity in murine bronchiolar epithelium. *Exp. Lung Res.*, 1991, **17**, 197-212.
- 194- POOLE, A. et BROWN, R.C.- *In Vitro* Methods to Investigate Toxic Lung Disease. In : ATTERWILL, C.K. et STEELE, C.E. (eds). *In Vitro* Methods in Toxicology. Cambridge : Cambridge University Press, 1987, 189-209.
- 195- PROCTOR, D.F. et CHANG, J.C.F.- Comparative anatomy and physiology of the nasal cavity. In : REZNIK, G. et STINSON, S.F. (eds). *Nasal Tumors in Animals and Man. Vol. I.* Boca Raton, Florida : CRC Press, 1983, 1-33.
- 196- RAMAZZINI, B.- Disease of workers. Traduction du texte latin *De Morbis Artificum* par Wright, W.C. New York and London : Hafner, 1964.
- 197- RAMPY, L.W.- Generating and controlling atmospheres in inhalation chambers. In : GRALLA, E.J. (ed). *Scientific Considerations in Monitoring and Evaluating Toxicological Research.* Washington, D.C. : Hemisphere, 1981.
- 198- REIF, J.S., BRUNS, C. et LOWER, K.S.- Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and exposure to environmental tobacco smoke in pet dogs. *American Journal of Epidemiology*, 1998, **147**(5), 488-492.
- 199- REISER, K.M. et LAST, J.A.- Early cellular events in pulmonary fibrosis. *Exp. Lung Res.*, 1986, **10**, 331-355.
- 200- RENNARD, S.I., FERRANS, V.J., BRADLEY, K.H. et CRYSTAL, R.G.- Lung connective tissue. In : WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds). *Mechanisms in Respiratory Toxicology. Vol. II.* Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, 115-154.
- 201- REZNIK-SCHULLER, H. et REZNIK, G.- Experimental pulmonary carcinogenesis. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 1979, **20**, 211-281.
- 202- ROBINSON, N.E. et GILLESPIE, J.R.- Pulmonary diffusing capacity and capillary blood volume in aging dogs. *J. Appl. Physiol.*, 1975, **38**(4), 647-650.
- 203- ROBINSON, N.E.- Some functional consequences of special differences in lung anatomy. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 1982, **26**, 1-33.
- 204- ROE, F.J.C.- Inhalation tests. *Mod. Trends Toxicol.*, 1968, **1**, 38-74.
- 205- ROONEY, S.A.- The surfactant system of the lung. In : WITSCHI, H.P. et BRAIN, J.D. (eds). *Toxicology of Inhaled Materials.* New York : Springer-Verlag, 1985, 471-502.
- 206- ROTH, J.A.- Use of perfused lung in biochemical toxicology. *Rev. Biochem. Toxicol.*, 1980, **1**, 287-309.
- 207- RUBERTE, J. et SAUTET, J.- *Atlas d'Anatomie du Chien et du Chat.* Barcelona : Multimédica. 1995.
- 208- SACHSSE, K., ZBINDEN, K. et ULLMANN, L.- Significance of mode of exposure in aerosol inhalation toxicity studies- Head only versus whole body exposure. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 1980, **4**, 305-311.
- 209- SAFFIOTTI, U.- Morphology of Experimental Respiratory Carcinogenesis, A.E.C. Symposium Series 21, U.S.A.E.C. Division of Technical Information, 1970, 45-250.
- 210- SAKKURA, Y. et PROCTOR, D.F.- The effect of various conditions on tracheal mucociliary transport in dogs. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1972, **140**, 870-879.

- 211- SALEM, H.- Inhalation Toxicology Research Methods, Applications and Evaluation. New York : Marcel Dekker Inc. and Basel, 1986.
- 212- SALEM, H. (ed). Inhalation Toxicology. New York : Marcel Dekker, 1987, 185-220.
- 213- SCHENKER, M.- Air pollution and mortality. *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**,1807-1808.
- 214- SCHIFF, L.J. (ed)- *In vitro* Models of Respiratory Epithelium. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1986.
- 215- SCHLESINGER, R.B. - Comparative deposition of inhaled aerosols in experimental animals and humans : a review. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1985, **15**, 197-214.
- 216- SCHLESINGER, R.B.- Clearance from the respiratory tract. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1985, **5**, 435-450.
- 217- SCHLESINGER, R.B.- Deposition and clearance of inhaled particles. In : Concepts in Inhalation Toxicology. McCLELLAN, R.O. et HENDERSON, R.F. (eds.). New York : Hemisphere, 1989, p 164.
- 218- SCHRECK, R.M., CHAN, T.L. et SODERHOLM, S.C.- Design operation and characterization of large volume exposure chambers. In : LEONG, B.K.J. (ed). Proceedings of the Inhalation Toxicology and Technology Symposium. Michigan : Ann Arbor Science, 1981.
- 219- SCHREIDER, J.P. et RAABE, O.- Anatomy of the nasal-pharyngeal airway of experimental animals. *Anat. Rec.*, 1981, **200**, 195-205.
- 220- SCHREIDER, J.P.- Comparative anatomy and function of the nasal passages. In : BARROW, C.S. (ed). Toxicology of the Nasal Passages. New York : Hemisphere, 1986, 1-26.
- 221- SCHWARTZ, L.W.- Pulmonary responses to inhaled irritants and the morphological evaluation of these responses. In : SALEM, H. (ed). Inhalation Toxicology. Research Methods, Applications, and Evaluation. New York : Marcel Dekker, 1987, 293-348.
- 222- SHAMI, S.G., MATINEZ, L.A. et EVANS, M.J.- Type 2 cell proliferation related to migration of inflammatory cells into the lung. *Exp. Mol. Pathol.*, 1986, **44**, 344-352.
- 223- SHAMI, S.G. et EVANS, M.J.- Kinetics of pulmonary cells. In : PARENT, R.A. (ed). Comparative Biology of the Normal Lung. Treatise on Pulmonary Toxicology. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991, **1**, 145-155.
- 224- SHORE, S.A., AUSTEN, K.F. et DRAZEN, J.M.- Eicosanoids and the lung. In : MASSARO, D. (ed). Lung Cell Biology. New York : Marcel Dekker,1989, 1011-1089.
- 225- SIBILLEE, Y. et REYNOLDS, H.Y.- Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1990, **141**, 471-501.
- 226- SILVER, S.D.- Constant flow gassing chambers : Principles influencing design and operation. *J. Lab. Clin. Med.*, 1946, **31**, 1153-1161.
- 227- SMINIA, T., VAN DER BRUGGE-GAMELKOORN, G.J. et JENRISSSEN, S.H.M.- Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit. Rev. Immunol.*, 1989, **9**, 119-150.
- 228- SMITH, B.T.- Pulmonary cell and tissue cultures. In : WITSCHI, H.P. et BRAIN, J.D. (eds). Toxicology of Inhaled Materials. New York : Springer-Verlag, 1985, 181-202
- 229- SMITH, L.L. et NEMERY, B.- The lung as a target organ for toxicity. In : COHEN, G.M. (ed). Target Organ Toxicity. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1986, **2**, 45-80.
- 230- SMITH, L.L.- The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Ann. Rev. Physiol.*, 1986, **48**, 681-692.
- 231- SNIDER, G.L., KLEINERMAN, J., THURLBECK, W.M. et BENGALI, Z.H.- The definition of emphysema : Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1985, **132**, 182-185.
- 232- SNIDER, G.L., LUCEY, E.C. et STONE, P.J.- Animal models of emphysema. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1986, **133**, 149-169.

- 233- SOROKIN, S.P.- The respiratory system. In : WEISS, L. (ed). Histology. Cell and Tissue Biology. 5th Ed. New York : Elsevier Biomedical, 1983, 788-868.
- 234- STUART, B.O., WILLARD, D.H. et HOWARD, E.B.- In : HANNA, M.G., NETTESHEIM, P. et GILBERT, J.R. (eds). Inhalation Carcinogenesis. Clearing-house for Federal Scientific and Technical Information, NBS, U.S. Dept. Commerce, Springfield, VA, 1970, 131-135.
- 235- STUART, B.O., WILLARD, D.H., et HOWARD, E.B.- Studies of inhaled radon daughters, uranium ore dust, diesel exhaust and cigarette smoke in dogs and hamsters. In : WALTON, W.H. (ed). Inhaled Particles III. Surrey, England : Unwin, 1971, 543-553.
- 236- THURMOND, L.M. et DEAN, J.H.- Immunological responses following inhalation exposure to chemical hazards. In : GARDNER, D.E., CRAPO, J.D. et MASSARO, E.J. (eds). Toxicology of the lung. New York : Raven Press, 1988, 375-406.
- 237- TILLERY, M.I., WOOD, G.O. et ETTINGER, H.J.- Generation and characterization of aerosols and vapors for inhalation experiments. *Environ. Health Perspect.*, 1976, **16**, 25-40.
- 238- TIMBRELL, V.- Inhalation of fibrous dusts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965, **132**, p 255.
- 239- VAINIO, H. et HIETANEN, E.- Role of extrahepatic metabolism. In : JENNER, P. et TESTA, B. (eds). Concepts in Drug Metabolism. Part A. New York : Marcel Dekker, 1980, 251-284.
- 240- VAN SCOTT, M.R., YANKASSAS, J.R. et BOUCHER, R.C.- Culture of airway epithelial cells : Research techniques. *Exp. Lung Res.*, 1986, **11**, 75-94.
- 241- VINCENT, J.H.- Aerosol Sampling-Science and Practice. Chichester : Wiley ,1989.
- 242- VINCENT, J.H.- Aerosol Science for Industrial Hygienists. Oxford : Pergamon Press, 1995.
- 243- WALTON, W.H.- Inhaled Particles. New York : Pergamon Press, 1977.
- 244- WALTON, W.H.- Inhaled Particles. Proceedings of Symposium on Inhaled Particles and Vapours. New York : Pergamon Press, 1982.
- 245- WARHEIT, D.B., GEORGE, G., HILL, L.H. et *al.*- Inhaled asbestos activates a complement-dependent chemoattractant for macrophages. *Lab. Invest.*, 1985, **52**, 505-514.
- 246- WEIBEL, E.- Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol. Rev.*, 1973, 419-495.
- 247- WEIBEL, E.R.- Is the lung built reasonably? The 1983 J. Burns Anderson lecture. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1983, **128**, 752-760.
- 248- WEISS, S.J. et LOBUGLIO, A.F.- Biology of diseases. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Laboratory Investigations*, 1982, **47**, 5-18.
- 249- WHITCUTT, M.J., ADLER, K.B. et WU, R.- A biphasic chamber system for maintaining polarity and differentiation of culture respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1988, **24**, 420-428.
- 250- WHO- Inhalation exposure. In : Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Part I. Environmental Health Criteria 6. Geneva: World Health Organization, 1978.
- 251- WIDDICOMBE, J.G.- Respiratory reflexes. In : FEHN, W.O. et RAHN, H. (eds). Handbook of Physiology. Section 3 : Respiration. Washigton : American Physiological Society, 1964, **1**, 585-630.
- 252- WIEBEL, F.J., LAMBIOTTE, M., SUMMER, R.H. et WOLFF, T.- Established cell cultures as model systems for carcinogen metabolism. In : PULLMAN, B. et GELBOIN, H. (eds). Carcinogenesis - Fundamental Mechanisms and Environmental Effects. Amsterdam : Reidel, 1980, 347-361.
- 253- WILSON, A.G.E.- Toxicokinetics of uptake, accumulation, and metabolism of chemicals by the lung. In : WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds). Mechanisms in Respiratory Toxicology. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982, **1**, 161-185.

- 254- WINKLER, G.C.- Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: Review of structural and functional properties. *Am. J. Anat.*, 1988, **181**, 217-234.
- 255- WITSCHI, H.P. et NETTESHEIM, P. (eds)- Mechanisms in Respiratory Toxicology, Vols. I and II. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982.
- 256- WITSCHI, H.P. et HAKKINEN, P.J.- The role of toxicological interactions in lung injury. *Environ. Health Prespect.*, 1984, **55**, 139-148.
- 257- WITSCHI, H.P. et BRAIN, J.D. (eds).- Toxicology of Inhaled Materials. New York : Springer-Verlag, 1985.
- 258- WITSCHI, H.P., TRYKA, A.F. et LINDENSCHMIDT, R.C.- The many faces of an increase in lung collagen. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1985, **5**, 240-250.
- 259- WITSCHI, H.R. et LAST, J.A.- Toxic Responses of the Respiratory System. In : KLAASSEN, C.D. (ed). Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 5e Edition. New York : McGraw-Hill. 1995, 443-462.
- 260- WITSCHI, H.- The story of the man who gave us 'Haber's Law'. *Inhal. Toxicol.*, 1997, **9**, 201-209.
- 261- WRIGHT, B.M.- Experimental studies on the relative importance of concentration and duration of exposure to dust inhalation. *Br. J. Ind. Med.*, 1957, **14**, 219-228.
- 262- WRIGHT, B.M.- A new nebuliser. *Lancet*, **ii**, 1958, 24-25.
- 263- WU, R., SATO, G.H., et WHITCUTT, M.J.- Developing differentiated epithelial cell cultures : Airway epithelial cells. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1986, **6**, 580-590.
- 264- ZIMMERMAN, B.- Lung organoid culture. *Differentiation*, 1987, **36**, 86-109.

Toulouse, 2006

NOM : DUPRAT

Prénom : Audrey

TITRE : METHODOLOGIE DES ESSAIS DE TOXICITE PAR INHALATION CHEZ LE CHIEN. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

RESUME :

La pollution atmosphérique, d'origine naturelle ou industrielle, constitue un risque majeur pour l'homme et peut être à l'origine d'affections pulmonaires ou systémiques. La protection de la santé publique nécessite une évaluation du risque utilisant des modèles animaux. L'objectif de cette étude bibliographique est de rassembler les méthodes utilisées en toxicologie par inhalation chez le chien.

Après avoir rappelé la physiopathologie de l'appareil respiratoire du chien et les mécanismes impliqués dans le devenir des xénobiotiques inhalés, les modalités pratiques des études sont précisées. Les différents essais de toxicité par inhalation en toxicologie réglementaire et les réponses lésionnelles observées chez le chien sont ensuite détaillées. Enfin, l'exploitation des données issues de ces expositions expérimentales permet d'estimer le risque pour l'homme résultant d'une exposition par inhalation.

MOTS-CLES : toxicité - inhalation - chien - pollution - appareil respiratoire.

ENGLISH TITLE : METHODOLOGY OF INHALATION TOXICOLOGY ON THE DOG.
A REVIEW.

ABSTRACT :

Air pollution, from natural or industrial sources, constitutes a risk to human and may result in the development of respiratory or systemic diseases. Public health protection needs risk assessment which uses animal models. This review is intended to give the reader an overview of the methods used in inhalation toxicology on the dog.

After a discussion about the physiopathology of the canine respiratory tract and the mechanisms involved in the fate of inhaled xenobiotics, practical methods of inhalation studies are specified. Then, the different inhalation studies and the responses to injury observed in dogs are explained. Finally, experimental exposure data are used to assess the risk to human health resulting from inhalation exposure.

KEY WORDS : toxicity - inhalation - dog - pollution - respiratory system.