

Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la formation des adhérences post opératoires

Mohamed Jallouli¹, Ahmed Hakim², Abir Znazen³, Yosr Chaabouni⁴, Zouheir Sahnoun³, Adnene Hammami³, Khaled Zeghal², Riadh Mhiri¹

1 : Service de chirurgie pédiatrique. Centre Hospitalo-universitaire Hédi Chaker, Faculté de médecine de Sfax, Université de Sfax. Tunisie

2 : Service de pharmacologie. Faculté de médecine de Sfax. Université de Sfax. Tunisie

3 : Service de microbiologie. Centre Hospitalo-universitaire Habib Bourguiba . Faculté de médecine de Sfax, Université de Sfax. Tunisie

4 : Service de Néphrologie. Centre Hospitalo-universitaire Hédi Chaker. Faculté de médecine de Sfax, Université de Sfax. Tunisie

M. Jallouli, A. Hakim, A. Znazen, Y. Chaabouni, Z. Sahnoun, A. Hammami, K. Zeghal, R. Mhiri

M. Jallouli, A. Hakim, A. Znazen, Y. Chaabouni, Z. Sahnoun, A. Hammami, K. Zeghal, R. Mhiri

Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la formation des adhérences post opératoires

The role of neutrophils in the formation of peritoneal adhesion

LA TUNISIE MEDICALE - 2012 ; Vol 90 (n°10) : 730 - 734

LA TUNISIE MEDICALE - 2012 ; Vol 90 (n°10) : 730 - 734

RÉSUMÉ

Prérequis : L'utilisation d'antibiotique en per opératoire semble diminuer la formation d'adhérences intra péritonéales postopératoires et réduire leur sévérité. L'effet de cette antibiothérapie est encore sujet à controverse.

But : Etudier la relation entre la diminution du nombre des adhérences post opératoire induites par la rifamycine sodique et le nombre de polynucléaires neutrophiles et le nombre de bactéries intra péritonéales.

Méthodes : Il s'agit d'un travail expérimental prospectif, randomisé en simple aveugle réalisé sur des rats mâles adultes. Le produit utilisé pour le lavage péritonéal était la rifamycine sodique. Les animaux ont été randomisés en 3 groupes: Groupe S : lavage intrapéritonéal avec du sérum physiologique à 9%, Groupe R25 : lavage intrapéritonéal avec la Rifamycine sodique à la dose de 25 mg/kg et Groupe R 12,5 : lavage intrapéritonéal avec la Rifamycine sodique à la dose de 12.5 mg/kg. Les adhérences ont été évaluées selon Zulkhé par le même opérateur.

Résultats : Le score d'adhésion était significativement plus bas entre les groupes S et R12.5 (p=0.000) et le groupe S et le groupe R25 (p=0.01). Cependant, la différence n'était pas significative entre les deux groupes R 25 et R12.5 par rapport au groupe S (p=0.655). Le nombre de germes entre le moment de la résection caecale (avant lavage péritonéal) et le moment du décès ou du sacrifice a nettement diminué de manière significative au sein du groupes R25 en le comparant au groupe S (p=0.003). Cependant, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes S et R12,5 (p=0.106). Le nombre des leucocyte entre le moment de la résection caecale (avant lavage péritonéal) et le moment du décès ou du sacrifice a diminué de manière significative au sein des groupes R25 et R12,5 en les comparant au groupe S. Entre le groupe R25 et le groupe S, la différence est significative (p=0.037) de même entre le groupe R12,5 et le groupe S (p=0.026). Cependant, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes R 25 et R12,5 (p=0.712).

Conclusion : L'action de la rifamycine sodique sur les PNN semble être indépendante de son action antibactérienne. Ces constatations méritent d'être explorées à fin de mieux préciser le mécanisme de la neutropénie intra péritonéale par le lavage intra péritonéale par la rifamycine sodique et la relation entre neutropénie et adhérences post opératoires.

SUMMARY

Background : The use of antibiotics during peritonitis appears to decrease the formation of postoperative intra peritoneal adhesions and reduce their severity. The effect of this antibiotic is still controversial.

Aim: To study the relationship between the decrease postoperative adhesions induced by rifamycin, and the number of neutrophils and the number of intraperitoneal bacteria.

Methods: This is an experimental prospective, randomized single-blind study performed on adult male rats. The product used for the peritoneal lavage was rifamycin s. The animals were randomized into three groups: Group S: intra peritoneal lavage with saline to 9%, R25 Group: intra peritoneal lavage with rifamycin at a dose of 25 mg / kg group and 12.5 R: intra peritoneal lavage with rifamycin at a dose of 12.5 mg / kg. Adhesions score was evaluated according to Zulkhé by the same operator.

Results: The adhesion score was significantly lower between groups S and R12.5 (p = 0.000) and group S and group R25 (P = 0.01). However, the difference was not significant between the two groups R 25 and R12.5 compared to S group (p = 0.655). The number of bacteria between the time of caecal resection (before peritoneal lavage) and the time of death or sacrifice was significantly decreased significantly in the groups R25, comparing the group S (p = 0.003). However, there is no significant difference between groups S and R12,5 (p = 0.106). The number of neutrophils between the time of caecal resection (before peritoneal lavage) and the time of death or sacrifice decreased significantly in the groups R25 and R12,5 in comparison to the group S. Between the group R25 and the S group, the difference is significant (p = 0.037) as well between the group R12,5 and S (p = 0.026). However, there is no significant difference between the two groups R 25 and R12,5 (p = 0.712).

Conclusion: The action of rifamycin sodium on neutrophils seems to be independent of its antibacterial action. These findings deserve to be explored at the end to clarify the mechanism of neutropenia by intra peritoneal washing with rifamycin and the relationship between neutropenia and post-operative adhesions.

Mots-clés

Rifamycine ; péritonite ; lavage péritonéal

Key-words

Rifamycin ; peritonitis ; peritoneal lavage

Les brides ou adhérences intra péritonéales postopératoires sont très fréquentes, pouvant survenir après toute ouverture de la cavité péritonéale, quelque soit le type de chirurgie. Elles sont reconnues comme une des causes d'infertilité, de difficultés opératoires en cas de ré intervention, de certaines douleurs chroniques postopératoires et de la majorité des occlusions intestinales aiguës. Elles entraînent une charge de travail chirurgical importante et des coûts induits élevés [1, 2], 1% des admissions en chirurgie et 3% des laparotomies [3]. L'utilisation d'antibiotique systémique postopératoire semble diminuer la formation d'adhérences intra péritonéales postopératoires et réduire leur sévérité. L'effet de cette antibiothérapie est encore sujet à controverse. Dans un premier travail, nous avons montré que le lavage péritonéal par la rifamycine sodique réduit le nombre d'adhésion et améliore le pronostic des infections intra abdominales [4].

Le but de ce travail est d'étudier la relation entre la diminution du nombre des adhérences post opératoire induites par la rifamycine sodique et le nombre des polynucléaires neutrophiles (PNN) et le nombre de bactéries intra péritonéales.

MÉTHODES

Il s'agit d'un travail expérimental prospectif, randomisé en simple aveugle concernant le nombre des adhérences post opératoire induites par la rifamycine sodique et les PNN et les bactéries intra péritonéales. Notre étude a été réalisée sur des rats mâles adultes, Wistar blancs pesant entre 200-250 g (élevage Institut Pasteur de Tunis). Les animaux étaient placés dans une animalerie où la température était maintenue à 21°C (± 2 degrés), l'humidité à 60% (± 5 %) et le cycle de lumière / obscurité à 12 heures. Les rats ont un accès libre à l'eau et à une alimentation faite de boulettes riche en glucide, lipides et protides. Le produit utilisé pour le lavage péritonéal était la rifamycine sodique (RS) SV : c'est la forme à administration parentérale (Intraveineuse : IV ou intramusculaire : IM), et à administration locale (cutané, auriculaire et oculaire) fabriquée par le laboratoire « Lepetit-Italy » sous le nom commercial : Rifocin®. Les doses utilisées dans notre étude, sont respectivement 25 mg/kg (dose usuelle systémique en pathologie humaine) et 12,5 mg/ kg (dose utilisée dans les préparations locales).

Les animaux ont été randomisés aléatoirement et au début du protocole en trois groupes:

- Groupe S : lavage intrapéritonéal avec du sérum physiologique à 9%.
- Groupe R25 : lavage intrapéritonéal avec la (RS) à la dose de 25 mg/kg.
- Groupe R 12,5 : lavage intrapéritonéal avec la (RS) à la dose de 12,5 mg/kg.

Procédure chirurgicale : Tous les rats ont été mis à jeun 12h avant l'intervention (alimentation exclusive à l'eau). L'anesthésie a été induite par injection intra musculaire d'un mélange de Kétamine à la dose de 100 mg/kg et de Diazépam à la dose de 1 mg/kg. La procédure chirurgicale s'est déroulée sous respiration spontanée et dans des conditions d'asepsie.

La péritonite a été créée par ligature, ponction cœcale (PLC) selon la technique de Wichtermann et al. [5]. Tous les rats ont développé des symptômes 24 h après la création de la péritonite (une apathie, un exsudat oculaire et une pilo-érection). Une 2ème laparotomie a été réalisée avec prélèvement du liquide péritonéal pour examen bactériologique suivie d'une résection cœcale et d'un lavage de la cavité péritonéale.

Modalité du lavage péritonéal [6] : Au début nous avons réalisé un lavage péritonéal avec 30 ml/kg par du sérum physiologique (étape commune à tous les rats de tous les groupes). Dans un deuxième temps nous avons effectué un lavage avec 15 ml/ kg selon le groupe par du :

- Sérum physiologique : Groupe S
- Sérum physiologique + RS à la dose de 25mg/kg : Groupe R25
- Sérum physiologique + RS à la dose de 12,5 mg/kg: Groupe R12, 5

Après ce lavage, nous avons procédé à une fermeture de la paroi abdominale en un seul plan.

La mortalité a été observée toutes les 8 heures. Les rats décédés dans les 24 heures suivant la deuxième laparotomie ont été éliminés de l'étude. Les rats survivants ont été sacrifiés à J7 post opératoires. Le lavage par la RS a été bien toléré aux deux concentrations. Une autopsie systématique des rats décédés ou sacrifiés a été réalisée avec :

- Prélèvement du liquide péritonéal pour examen bactériologique.
- Estimation des adhérences.

Analyse bactériologique : Après prélèvements, les liquides péritonéaux ont été analysés immédiatement. La numération des leucocytes a été réalisée manuellement sur cellule de Malassez. Pour la culture quantitative, les échantillons ont été dilués de 10-1 à 10-4 dans du sérum physiologique. Chaque échantillon pure et dilué a étéensemencé à l'aide d'une anse calibrée à 10 μ l sur une gélose au sang et gélose bromochrésol pourpre, incubée en aérobiose à 37°C pendant 24 heures pour la détection des germes aérobies, et sur gélose au sang et sur gélose au sang additionnée de vancomycine et kanamycine incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures pour la détection des germes anaérobies strictes. Le résultat était exprimé comme en nombre d'unités formant colonie par millilitre de liquide péritonéal.

Score d'adhésion : Les adhérences ont été évaluées selon Zulkhé par le même opérateur [7]. Pour une meilleure évaluation des adhérences, la cavité abdominale a été subdivisée en 3 étages :

- L'étage sus mésocolique comprenant le foie, la rate et l'estomac :

Score de 0 à 4.

- Le grêle : Score de 0 à 4.

- Le cæcum et les testicules : Score de 0 à 4.

Le score total peut varier de 0 à 12.

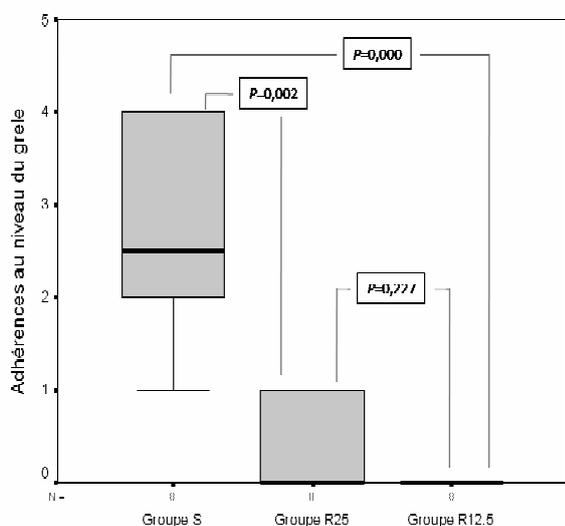
Etude statistique : Pour les paramètres étudiés, chaque résultat a été obtenu en faisant la moyenne des valeurs individuelles. Ils étaient exprimés en moyennes affectées de leurs erreurs standard à la moyenne. La comparaison des moyennes deux à deux a été assurée par le test de Student à l'intérieur de chaque

groupe considéré. Dans tous les cas le test a été considéré significatif lorsque le degré de signification P a été inférieur à 0,05 (P<0,05).

RÉSULTATS

Le score d'adhésion était significativement plus bas entre les groupes S et R12.5 (p=0.000) et le groupe S et le groupe R25 (p=0.01). Cependant, la différence n'était pas significative entre les deux groupes R 25 et R12.5 par rapport au groupe S (p=0.655). Cette différence est plus marquée lorsqu'on compare le score d'adhérence au niveau du grêle (figure 1).

Figure 1 : Score d'adhésion au niveau du grêle dans les groupes S, R12, 5 et R25 à l'autopsie après décès ou sacrifice.



Le liquide péritonéal prélevé le jour de la résection caecale avant le lavage péritonéale a montré une infection intra péritonéale poly microbienne. Il n'existait pas de différence significative entre les trois groupes concernant le taux basal des leucocytes et des bactéries. Le nombre de germes entre le moment de la résection caecale (avant le lavage péritonéal) et le moment du décès ou du sacrifice a nettement diminué de manière significative au sein du groupe R25 en le comparant au groupe S (p=0.003). Cependant, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes S et R12, 5 (p=0.106) (figure 2). Le nombre des leucocytes entre le moment de la résection caecale (avant lavage péritonéal) et le moment du décès ou du sacrifice a diminué de manière significative au sein des groupes R25 et R12, 5 en les comparant au groupe S. En effet, entre le groupe R25 et le groupe S, la différence était significative (p=0.037) de même entre le groupe R12, 5 et le groupe S (p=0.026). Cependant, il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes R 25 et R12, 5 (p=0.712) (figure 3).

Figure 2 : Evolution du nombre de germes dans les groupes S, R12, 5 et R25 entre le prélèvement fait au moment de la 2ème laparotomie et celui fait après décès ou sacrifice.

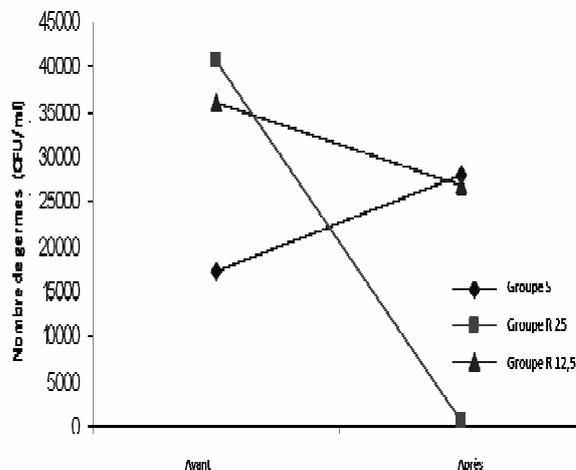
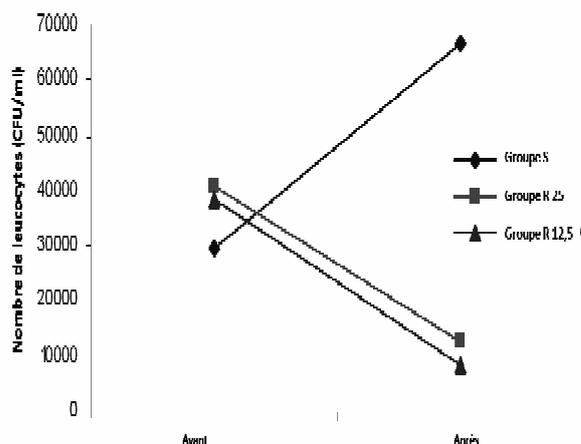


Figure 3 : Evolution du nombre de leucocytes dans les groupes S, R12, 5 et R25 entre le prélèvement fait au moment de la 2ème laparotomie et celui fait après décès ou sacrifice. Les valeurs sont en CFU/ml.



DISCUSSION

Dans notre étude, seule la diminution du nombre de leucocytes était significative au sein du groupes R25 en le comparant au groupe S (p=0.003). Cependant, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes S et R12, 5 (p=0.106). Le nombre de germes entre le moment de la résection caecale (avant lavage péritonéal) et le moment du décès ou du sacrifice a nettement diminué de manière significative au sein du groupes R25 en le comparant au groupe S (p=0.003). Par

contre, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes S et R12, 5 ($p=0.106$). Dans notre étude, aucun antibiotique par voie systémique n'a été utilisé. La diminution des adhérences est le résultat de l'utilisation de la rifamycine en intra abdominale.

Plusieurs processus peuvent intervenir dans la genèse des adhérences intra péritonéales postopératoires, en particulier le processus inflammatoire [8]. La chirurgie des péritonites va entraîner la production d'un exsudat au bout de 3h [8], suivi immédiatement par une réaction inflammatoire avec augmentation de la perméabilité vasculaire et augmentation de la fibrine dans l'exsudat [9]. Lorsque la fibrine n'est pas lysée en totalité, il va y avoir un dépôt de collagène et par la suite la genèse des adhérences intra péritonéales. Cet exsudat contient plusieurs cellules inflammatoires telles que les PNN et les monocytes [10], contrairement à l'état physiologique où la cavité péritonéale contient principalement des macrophages et des lymphocytes [8]. Les macrophages entraînent une diminution nette des adhérences intra péritonéales [10], en plus de l'inhibition de l'adhésion des PNN [11]. Durant les 3 premiers jours postopératoires, les éléments les plus importants sont les PNN et la fibrine jouant un rôle principale dans la genèse des adhérences intra péritonéales. En limitant l'afflux intra péritonéal des PNN en postopératoire immédiat, on peut diminuer la genèse des adhérences intra péritonéales postopératoires [12]. Les PNN en se fixant sur les cellules endothéliales vont entraîner une augmentation de la perméabilité capillaire, des œdèmes et des thromboses [13]. Plusieurs études expérimentales ont montré que les corticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent empêcher la migration des PNN et vont réduire par la suite la genèse des adhérences intra péritonéales [14]. Le cyclophosphamide peut aussi prévenir la genèse des adhérences intra péritonéales par l'intermédiaire de la neutropénie qu'il engendre [15]. La formation des adhérences intra péritonéales est le résultat de la déposition du collagène [16] qui représente la matrice principale de ces adhérences. Les PNN ont le potentiel de dégrader la matrice extracellulaire [17].

En effet, les serines protéases et les metalloprotéinases libérées par les PNN vont dégrader le collagène [18]. Dans certaines études, on a démontré que la libération des radicaux libres et des protéases neutres par les PNN est responsable de la dégradation du collagène [19,20]. Aamer et al [21] ont réalisé une étude expérimentale incluant 37 lapins randomisés en 2 groupes : le 1er groupe ($n = 16$) recevant des anticorps anti-CD18 en intra péritonéal et le 2ème groupe contrôle ($n=21$) recevant une solution saline en intra péritonéal. Six lapins dans chaque groupe ont été euthanasiés après 24h et un lavage péritonéal a été effectué afin de déterminer le nombre de PNN. Dix jours après, les lapins restant ont été euthanasiés et le score d'adhésion intra péritonéales a été évalué. Les auteurs ont démontré que le score d'adhésion intra péritonéales est diminué par l'inhibition de l'afflux des PNN et leur adhérence. En effet, les anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs des PNN vont inhiber l'adhésion des PNN aux cellules endothéliales et par la suite ils vont inhiber l'activation et la migration de ces dernières. Vural et al [15] ont étudié la relation entre la numération et la fonction des PNN et le nombre d'adhérences péritonéales. Cette étude a montré que la neutropénie abaisse le score d'adhésion postopératoire. L'effet bénéfique de l'administration des cyclophosphamides en per opératoire sur la formation des adhérences est expliqué par la réduction du nombre des PNN et de l'index phagocytaire de ces neutrophiles. Cette étude suggère que les PNN jouent un rôle dans la modulation des adhérences postopératoires.

Le caractère immunosuppresseur de la rifamycine pourrait expliquer nos résultats. Selon des études in vitro et chez l'animal, la rifampicine supprime la sécrétion du facteur d'inhibition de la migration lymphocytaire, la réponse des lymphocytes à la stimulation par des mitogènes non spécifiques et la production d'anticorps par des lymphocytes cultivés in vitro. Toutefois, l'importance clinique de ces observations reste inconnue. Une nouvelle étude avec détermination des mécanismes d'interaction entre rifamycine et PNN est à réaliser pour conforter nos première conclusion.

Références

1. Ellis H.Moran BJ., Thompson JN. et al. Adhesion-related hospital admissions after abdominal and pelvic surgery a retrospective cohort study. *Lancet* 1999; 353:1476-80.
2. Ray NF, Larsen JW, Stillman RJ, Jacobs RI. Economic impact of hospitalizations for lower abdominal adhesiolysis in the United States in 1988. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 271-76.
3. Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesion-how big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl* 1990; 72:60-3.
4. Jallouli M, Hakim A, Znazen A, et al. Rifamycin lavage in the treatment of experimental intra-abdominal infection. *J Surg Res* 2009;155:191-4.
5. Wichterman KA., Baue AE., Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and an proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-201.
6. Lally KP, Nichols RL. Various intraperitoneal irrigation solutions in treating experimental fecal peritonitis. *South Med J* 1981; 74: 789-91.
7. Lorenz EM, Straub EM. Pathophysiology and classification of adhesions. *Langenbecks Arch Chir.* 1990; Suppl II: 1009-16.
8. Pados, G.A, Devroey, P. Adhesions. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 1992; 4:412-18.
9. Ellis, H., Harrison, W. Hugh, T.B. The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *Br. J. Surg.* 1965;56: 471-75.
10. Rodgers, K.E, DiZerega, G.S. Modulation of peritoneal repithelization by postsurgical macrophages. *J. Surg. Res.* 1992; 53:542-49.
11. Arfors, K., Lundberg, C., Lindbom, L. et al. A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood.* 1987; 69: 338-40.
12. ten Raa S, van den Tol MP, Sluiter W, Hofland LJ, van Eijck CH, Jeekel H. The role of neutrophils and oxygen free radicals in post-operative adhesions. *J Surg Res.* 2006 ;136:45-52.

13. Harlan, J.M., Schwartz, B.R., Wallts, W.J, Pohlmann, T.H. The role of neutrophil membrane proteins in neutrophil emigration. *Leukocyte Emigration and its Sequel*. Krager, Basel, p. 94.
14. Replogle, R.L., Johanson, R, Gross, R. Prevention of postoperative intestinal adhesions with combined promethazine and dexamethasone therapy. *Experimental and clinical studies. Ann. Surg.* 1966; 163: 580-91.
15. Vural B, Cantürk NZ, Esen N, et al. The role of neutrophils in the formation of peritoneal adhesions. *Hum Reprod.*1999;14 :49-54.
16. Ar'Rajab A, Mileski W, Sentementes JT, Sikes P, Harris RB, Dawidson IJ. The role of neutrophils in peritoneal adhesion formation. *J Surg Res.* 1996; 15:143-6.
17. Sopata, I., Wojtecka-Lukasik, E., Wize, J, Maslinski, S. Neutrophil enzyme activities in carrageenan-induced inflammation in rats. *Agents action.* 1989; 28: 89-92.
18. Vissers, M.C., Winterbourn, C.C. Gelatinase contributes to the degradation of glomerular basement membrane collagen by human neutrophils. *Collq. Relat. Res.* 1988;8: 113-22.
19. Thompson, J. N., Paterson-Brown, S., Harbourne, T. et al. Reduced human peritoneal plasminogen activating activity: possible mechanism of adhesion formation. *Br. J. Surg.* 1989; 76: 382-84.
20. Hogstrom, H, Haglund, U. Neutropenia prevents decrease in strength of rat intestinal anastomosis: Partial effect of oxygen free radical scavengers and allopurinol. *Surgery.* 1986; 99, 716-23.
21. Jonsson, T, Hogstrom, H. Neutrophil-dependent decrease in early wound margin strength. *Arch. Surg.* 1991; 126: 1423-31.
22. Shorderet M. et al. *Livre de pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.* Ed. Frison Roche Slatkine, 3ème Ed., 1998.