

A Joseph,
à Clara

Remerciements

Ceux qui me connaissent savent que je ne suis pas quelqu'un qui sait faire des éloges et pardonnez-moi si mes remerciements vous semblent trop brefs. Je vais tenter de n'oublier personne qui aurait contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Professeur Serteyn, promoteur et Chef, à qui je dois ma formation en tant que clinicien, chirurgien et chercheur. Il a toujours su me guider, me conseiller, me corriger et aussi me libérer de la clinique pour avancer dans la rédaction.

Un grand merci également au Docteur Deby-Dupont, qui a toujours ouvert les portes du Laboratoire de Biochimie de l'Oxygène pour moi et sans qui ce travail de recherche n'aurait pu être réalisé. En outre c'est une personne chez qui on peut toujours trouver une réponse à ses questions.

Je remercie le Professeur Honoré pour avoir accepté d'être le troisième membre de mon comité de thèse malgré ses charges de travail et pour m'avoir accueillie dans le bloc opératoire.

A ma collègue Monika qui m'a remplacée en clinique et qui s'est surchargée de travail, je suis particulièrement reconnaissante car sinon ce travail n'aurait jamais pu se terminer. Merci aussi à Fabrice, qui m'a beaucoup aidée avec des problèmes logistiques, à Kamal, à Philippe M. et à Isabelle. Un grand merci également à Evelyne pour toutes les corrections.

Un grand merci à Jean-François Bradfer pour la réalisation des coupes de microscopie électronique, un travail de précision. Le personnel du Laboratoire de Biochimie a aussi fortement contribué aux résultats obtenus avec leur travail rapide et efficace. Pour les échanges scientifiques je remercie tous les membres du Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement (CORD), et en particulier les Professeurs Lamy et Deby. Un grand merci aussi à Thierry Franck, pour sa patience et ses explications dans les techniques de laboratoire.

Pour leur assistance aux examens anatomo-pathologiques du pancréas j'aimerais remercier Dominique, Eric, Marianne Heimann et le Prof. Dessy-Doize. A Joanne et à Frédérique un grand merci pour l'aide dans les modèles d'analyses statistiques.

Je remercie vivement tous les résidents et internes de ces dernières années qui ont grandement contribué à ce travail avec d'une part la réalisation des prises de sang et aussi avec les soins apportés aux sujets d'études, les chevaux opérés de coliques. Ils m'ont aussi permis de m'absenter de la clinique pour avancer dans la rédaction. Un grand merci à tout le personnel et ex-personnel de la Chiga (Mireille, Manu, Sylvie, Louise, Marc C., Philippe, Marc S., Florence) pour m'avoir encouragée et aidée et pour la bonne ambiance de travail qui règne dans notre secteur.

A tous les vétérinaires référents et propriétaires de chevaux en coliques qui nous ont confiés leurs animaux je dis un grand merci, car sans eux le travail n'aurait pu se réaliser. Un grand merci aux chevaux de la Gendarmerie ou de la Police fédérale, aux poulains de Mont-le-Soie et aux autres chevaux donneurs de sang ainsi qu'à leurs propriétaires pour avoir permis d'établir les valeurs de référence physiologiques.

Cette thèse a pu se réaliser grâce au soutien financier du Fonds National de la Recherche Scientifique de Belgique (n° 1.5.066.00) et au Fonds de Recherche Scientifique et Médicale (n° 3.4615.98) ainsi qu'au Fonds spéciaux de la Recherche.

Je voudrais remercier mes amies, en particulier Myriam et Elke, pour leurs encouragements. Vielen Dank und Alles Gute auch an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

En dernier lieu j'aimerais remercier le plus chaleureusement ceux qui ont souffert le plus, de mon absence physique et mentale, lors de la réalisation de ce travail, Joseph et Clara. Sans la patience de Joseph et la bonne humeur de ma petite fille, je n'aurais jamais pu arriver au bout de cette thèse.

Un grand Merci à tous,

Sigrid Grulke.

AVANT-PROPOS

Les coliques du cheval restent la première cause de mortalité et de morbidité chez le cheval. Il s'agit le plus souvent d'obstructions intestinales. Celles-ci, lorsqu'elles sont associées à des perturbations circulatoires, vont induire rapidement le développement d'un choc endotoxique irréversible. Malgré les progrès des méthodes de diagnostic, d'anesthésie, de chirurgie et de soins intensifs, le pronostic des obstructions intestinales étranglées reste mauvais. La nécessité de poursuivre des recherches dans ce domaine s'avère donc justifiée.

En médecine humaine, l'implication des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et l'hypoperfusion splanchnique sont considérées depuis peu comme deux éléments majeurs dans la physiopathologie de l'état de choc et la défaillance multisystémique. Chez le cheval, ces aspects sont peu étudiés et seront abordés au cours de nos études.

L'objectif global de ce travail est d'apporter quelques éléments originaux à la physiopathologie des obstructions intestinales et ses conséquences chez le cheval.

Ce travail se présente en trois parties. La première partie reprend, à partir des données connues en médecine équine et humaine, les éléments essentiels des aspects cliniques et de la physiopathologie des obstructions intestinales ainsi que certains aspects du choc qui peut en résulter. La deuxième partie se compose d'une présentation synoptique des investigations réalisées et d'une discussion générale des résultats. La troisième partie reprend, de manière systématique, les publications sur lesquelles se base ce travail.

Résumé

Les coliques du cheval et en particulier les obstructions étranglées restent une préoccupation majeure à cause de la morbidité et de la mortalité qu'elles entraînent. En dépit des recherches entreprises, il persiste de nombreuses questions en ce qui concerne la pathogénie du choc et la défaillance multisystémique. Les méthodes servant à établir un pronostic se basent en général sur les signes évaluant l'état de choc mais peu sur des critères cliniques.

Nous avons mis au point une méthode d'évaluation du pronostic se basant sur des paramètres cliniques qui mesurent le degré d'obstruction intestinale. L'indice de gravité ainsi développé a également servi à classer les différents types de coliques afin de pouvoir les comparer lors d'études sur la pathogénie du choc. Nous avons remarqué que dans nos régions ce sont les obstructions étranglées de l'intestin grêle qui prédominent et en particulier les incarceration dans le foramen épiploïque. C'est la présence d'une affection de l'intestin grêle ainsi que celle d'un état de choc préopératoire qui augmentent significativement le temps de récupération.

La myéloperoxydase équine (MPOE), une enzyme granulaire des neutrophiles, témoigne de l'activation des granulocytes lorsqu'elle est présente dans le plasma. Sa purification à partir de sang équin (30 L) nous a permis de déterminer ses caractéristiques (poids moléculaire, sous-unités, dépendance du pH, absorbance) qui sont fort similaires à l'enzyme humaine et de développer un dosage radio-immunologique. Les normes physiologiques que nous avons établies chez des chevaux sains ($69 \pm 28,5$ ng/mL) sont significativement dépassées dans divers cas de pathologies abdominales aiguës. C'est le cas chez les chevaux souffrant d'obstructions étranglées du gros intestin et chez ceux qui ne survivent pas à la pathologie. Chez les chevaux qui survivent et qui souffrent d'une obstruction non étranglée, les taux plasmatiques augmentent légèrement puis retournent à la normale. Cette augmentation de MPOE est associée à une leucopénie qui confirme l'activation et la diapédèse des neutrophiles.

Le dosage enzymatique de la trypsine nous a permis d'établir des normes plasmatiques chez le cheval (28.5 ± 19.2 ng/mL). Comme chez l'homme, il existe une certaine résorption

intestinale. La purification de la trypsine nous a permis de mettre au point son dosage radio-immunologique. Les chevaux en état de choc sévère, en particulier ceux souffrant d'obstructions étranglées de l'intestin grêle, développent une augmentation significative des taux plasmatiques de trypsine. Cette augmentation significative est toujours présente pendant la période post-opératoire et elle est plus importante chez les chevaux qui présentent des complications sévères. Cette trypsine plasmatique pourrait contribuer à l'apparition de diverses complications suite à ses effets d'activation du complément, des leucocytes et de la coagulation. Cependant, plusieurs chevaux ne souffrant pas de nécrose intestinale ont montré une augmentation de la trypsine plasmatique. Ceci fait plutôt soupçonner une souffrance pancréatique due à l'hypoperfusion splanchnique.

Un examen histo-pathologique du pancréas a été effectué sur des chevaux qui présentent des lésions intestinales irréversibles et un état de choc sévère. La microscopie optique montre des lésions de dégénérescence vacuolaire. En microscopie électronique à transmission une importante vacuolisation du réticulum endoplasmique rugueux est dans certains cas accompagnée du détachement des ribosomes, de la formation de mégamitochondries et de vacuoles autophagiques.

Ces études ouvrent la voie à d'autres recherches permettant de cerner la contribution de l'activation des neutrophiles et de la souffrance pancréatique dans les complications post-opératoires comme l'iléus paralytique ou la fourbure ainsi que dans d'autres pathologies septiques chez le cheval.

Summary

The gastro-intestinal disorders in the horse, especially strangulation obstructions requiring surgery, remain a major problem because of the ensuing morbidity and the mortality. In spite of better survival rates after surgical colic and a lot of research done about the subject, several questions remain concerning the pathogenesis of shock and the multiple complications that may lead to multiple organ failure. Several clinical studies have shown the variation of incidence of the different colic types. The methods utilised for giving a prognosis are nearly exclusively based on shock symptoms and comparison of clinical cases remains difficult because of the diversity of pathologies that occur.

A retrospective clinical study was realised and established a clinical score based on parameters estimating the degree of intestinal obstruction in order to evaluate the survival. The established gravity score had a good prognostic value and permitted to classify the different types of colic for comparison of cases in other studies about the pathogenesis of shock in colicky horses. We could also evaluate the incidence of the colic types seen in our region and the specific complications following colic surgery. It appeared that strangulating small intestine obstruction and especially incarceration into the epiploic foramen has a high incidence. Complications were more severe and the recovery was delayed for small intestine affections as well as for severely shocked horses.

A biochemical study wanted to evaluate the activation of granulocytes during surgical colic by the measurement of equine plasmatic myeloperoxidase (MPOE), a specific enzyme of primary granules of neutrophils that is liberated during the activation of these cells. In order to develop a radio-immunoassay (RIA), MPOE has been purified from equine blood and the characteristics of the equine enzyme were shown to be similar to the human enzyme (molecular weight, subunits, pH dependency, absorbance). After the development of RIA, reference values of normal horses were established (69 ± 28.5 ng/mL). In cases of acute abdominal pathology a significant increase of MPO was observed. The progression of MPO plasma concentrations in horses suffering from obstruction of large intestine requiring surgery were also studied. MPOE showed very high levels especially during the early post-operative period. In non survivors with strangulation obstruction the concentrations maintained high,

whereas slightly increased MPO values normalised in horses that survived. The increase of MPO was accompanied by a decrease of leukocytes confirming the activation and diapedesis of these cells.

An enzymatic assay of trypsin has been utilised to establish a reference range for healthy horses (28.5 ± 19.2 ng/mL). This shows that likely to humans intestinal reabsorption of trypsin occurs. The purification of trypsin was realised with equine pancreatic tissue and a radio-immunoassay was developed. The plasma trypsin concentrations were significantly higher in horses with intestinal obstruction showing severe endotoxic shock than in those without shock signs. Cases with small intestinal obstruction also tended to have higher concentrations than large intestine obstructions. During the post-operative phase plasma trypsin activity increased in all the horses and increase was more severe when complications occurred. As trypsin is able to activate the complement, the leukocytes and the coagulation cascade, the presence of trypsin especially the presence of enzymatically active trypsin may contribute to several complications after colic surgery.

A histo-pathological evaluation of the pancreas has been done by means of light microscopy and transmission electron microscopy. The exocrine pancreas had slight to severe vacuolar degeneration. Transmission electron microscopy showed vacuolisation of rough endoplasmic reticulum, sometimes accompanied by detachment of ribosomes, formation of megamitochondria and autophagic vacuoles. The lesions were more severe in horses presenting severe shock signs.

Theses results should lead to further studies, in order to evaluate more precisely the contribution of neutrophil activation and of pancreatic lesions to the post-operative complications like paralytic ileus and laminitis in cases of surgical colic as well as their contribution to other septic equine pathologies.

Table des matières

Résumé	13
Summary	15
Première partie : Revue de la littérature	17
A. Aspects cliniques des obstructions intestinales aiguës	18
1. Diagnostic et pronostic des obstructions intestinales aiguës du cheval	18
1.1. Définition et classification des obstructions intestinales aiguës.....	18
1.2. Incidence, causes éventuelles et taux de survie des différentes obstructions.....	19
1.2.1. Intestin grêle.....	21
1.2.2. Gros intestin.....	22
1.3. Moyens de diagnostic.....	24
1.4. Pronostic.....	25
1.4.1. Paramètres individuels.....	25
1.4.2. Paramètres combinés.....	26
2. Traitements et complications des obstructions intestinales aiguës	27
2.1. Traitement chirurgical.....	27
2.1.1. Traitement médicamenteux préopératoire.....	27
2.1.2. Types de laparotomies et approches chirurgicales.....	28
2.2. Anesthésie.....	30
2.3. Soins post-opératoires.....	30
2.4. Complications post-opératoires et leur traitement.....	31
2.4.1. Iléus paralytique post-opératoire.....	31
2.4.2. Péritonite.....	35
2.4.3. Adhérences abdominales.....	37
2.4.4. Infection et déhiscence de plaie de laparotomie.....	39
2.4.5. Fourbure.....	40

B. Physiopathologie des obstructions intestinales et du choc	43
1. Modifications physiopathologiques locales de l'obstruction intestinale	43
1.1. Obstruction intestinale.....	43
1.2. Obstruction intestinale étranglée.....	43
1.2.1. Aspect clinique et microscopique des lésions de l'intestin grêle.....	44
1.2.2. Aspect clinique et microscopique des lésions du gros intestin.....	45
2. Lésions d'ischémie – reperfusion	46
3. Formes activées de l'oxygène et de l'azote (RNOS)	46
3.1. Caractéristiques des réactions formant les RNOS.....	46
3.1.1. Equilibre oxydo-réducteur ou état « rédox » de la cellule.....	47
3.2. Cascade des formes activées de l'oxygène et de l'azote (RNOS).....	48
3.2.1. Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	48
3.2.2. Monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et peroxynitrite ($ONOO^-$).....	48
3.2.3. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	49
3.2.4. Radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$).....	50
3.2.5. Acide hypochloreux ($HOCl$).....	50
3.3. Agressions oxydantes.....	53
3.4. Rôle de la myéloperoxydase.....	55
3.4.1. Caractéristiques de la MPO humaine.....	56
3.4.2. Espèces oxydantes produites par la MPO.....	57
3.4.2.1. <i>Activité antimicrobienne de la MPO</i>	58
3.4.2.2. <i>Effets cytotoxiques de la MPO</i>	58
3.4.2.3. <i>Effets modulateurs de la MPO sur les</i> <i>fonctions cellulaires</i>	59
4. Aspect biochimique de l'ischémie – reperfusion	59
4.1. Approche globale du phénomène.....	59
4.2. Mécanismes cellulaires de l'ischémie – reperfusion	61
4.2.1. Pool des nucléotides adénylés.....	61

4.2.2. Augmentation du Ca ²⁺ cytosolique.....	62
4.2.3. Production des RNOS au niveau mitochondrial et cytosolique.....	63
5. Translocation bactérienne, absorption d’endotoxines et d’enzymes digestives.....	64
6. Activation des granulocytes <i>in situ</i>.....	65
6.1. Mécanismes d’adhésion et d’extravasation des PMN.....	66
6.2. Implication des granulocytes chez le cheval.....	66
7. Conséquences à distance de l’obstruction intestinale.....	67
7.1. Hypoperfusion splanchnique.....	67
7.2. Familles de protéases et leur origine.....	67
7.2.1. Caractéristiques des enzymes pancréatiques et en particulier de la trypsine.....	68
7.3. Enzymes leucocytaires et leur activité.....	68
7.4. Antiprotéases : types et origine.....	69
7.5. Présence d’enzymes pancréatiques dans la circulation générale.....	70
7.5.1. Effets systémiques de la trypsine.....	71
7.6. Perturbation de l’équilibre protéases – antiprotéases.....	73
8. Développement du choc endotoxique.....	73
8.1. Médiateurs libérés par l’activation des monocytes.....	74
8.1.1. Facteur nécrosant des tumeurs ou tumor necrosis factor α (TNF- α).....	74
8.1.2. Interleukine 1 β (IL-1 β).....	75
8.1.3. Interleukine 6 (IL-6).....	75
8.1.4. Interleukine 8 (IL-8).....	75
8.1.5. Interleukine 10 (IL-10).....	76
8.1.6. Eicosanoïdes.....	76
8.1.7. Facteur tissulaire ou thromboplastine.....	77
8.1.8. Facteur agrégeant des plaquettes (PAF).....	77
8.2. Stimulation des cellules endothéliales et des polymorphonucléaires.....	77
8.3. Choc endotoxique.....	78

C. Objectifs de nos études	79
---	----

D. Bibliographie	80
-------------------------------	----

Deuxième partie : Présentation synoptique des résultats	106
--	-----

A. Approche clinique des pathologies intestinales chirurgicales

équines (études 1 et 2)	107
--------------------------------------	-----

1. Matériel et méthode : Examens, interventions et traitements pratiqués sur les

cas de coliques chirurgicales (réculte des données)	107
--	-----

1.1. Présentation du protocole d'examen.....	107
--	-----

1.2. Développement de l'indice de gravité (IG).....	110
---	-----

1.2.1. Choix des paramètres cliniques.....	110
--	-----

1.3. Choix d'un indice de choc (IC).....	111
--	-----

1.4. Traitement préopératoire.....	112
------------------------------------	-----

1.5. Anesthésie.....	112
----------------------	-----

1.6. Chirurgie.....	112
---------------------	-----

1.7. Phase post-opératoire.....	113
---------------------------------	-----

1.7.1. Soins post-opératoires classiques.....	113
---	-----

1.7.2. Définition du temps de récupération.....	115
---	-----

1.7.3. Diagnostic et traitement des complications.....	115
--	-----

2. Sélection des cas et analyse des données	116
--	-----

2.1. Données sélectionnées pour l'analyse.....	116
--	-----

2.2. Analyse statistique.....	117
-------------------------------	-----

3. Résultats des études cliniques (études 1 et 2)	118
--	-----

3.1. Incidence des différentes pathologies.....	118
---	-----

3.2. Taux de survie.....	120
--------------------------	-----

3.3. Evaluation du pronostic par indice de gravité et indice de choc.....	120
---	-----

3.4. Incidence des complications.....	122
---------------------------------------	-----

3.5. Temps de récupération.....	122
4. Discussion.....	124
B. Approche biochimique : étude de la myéloperoxydase, de la trypsine et du pancréas.....	125
1. Myéloperoxydase (MPO) (études 3-5).....	125
1.1. Introduction : Justification de l'intérêt porté à la MPO.....	125
1.2. Purification et dosage de la myéloperoxydase équine (MPOE).....	126
1.2.1. Purification de la MPOE (Etude 3).....	127
1.2.2. Dosages enzymatiques de la MPO (activité de peroxydase et de chlorination).....	127
1.2.3. Développement d'un dosage radio-immunologique (RIA) de la MPOE (Etude 4).....	128
1.2.3.1. Conditions générales de dosage.....	128
1.2.3.2. Caractéristiques du RIA : spécificité, sensibilité, précision, exactitude et reproductibilité.....	129
1.2.4. Caractéristiques de la MPOE et effet du mode de prélèvement.....	129
1.2.5. Valeurs de référence de MPOE chez le cheval sain, effets du transport et de l'anesthésie.....	130
1.3. Evolution de la MPOE plasmatique dans la pathologie abdominale aiguë.....	130
1.4. Evolution de la MPOE plasmatique dans l'obstruction du gros intestin (Etude 5).....	131
1.5. Discussion.....	133
2. Trypsine et pancréas (études 6-8).....	134
2.1. Introduction : Justification de l'intérêt porté à la trypsine et au pancréas.....	134
2.2. Dosage de la trypsine.....	134
2.2.1. Dosage enzymatique de la trypsine (Etude 6).....	135
2.2.2. Dosage radio-immunologique de la trypsine (Etude 7).....	136
2.2.2.1. Purification.....	136

2.2.2.2. <i>Mise au point du dosage immunologique (RIA)</i>	137
2.3. Trypsine : valeurs de référence et l'évolution des concentrations plasmatiques en cas d'obstruction intestinale.....	138
2.3.1. Valeurs normales chez les chevaux sains.....	139
2.3.1.1. <i>Trypsine enzymatiquement active (TEA)</i>	139
2.3.1.2. <i>Trypsine immunoréactive (TIR)</i>	139
2.3.2. Variations du taux de TEA dans les cas d'obstruction intestinale (Etude 6).....	139
2.3.3. Evolution de la TEA en période post-opératoire.....	141
2.3.4. Evolution de la TIR plasmatique chez les chevaux en obstruction intestinale : résultats préliminaires (Etude 7).....	142
2.4. Pancréas (Etude 8).....	143
2.4.1. Prélèvement du pancréas.....	143
2.4.2. Préparation des coupes pour la microscopie optique.....	144
2.4.3. Préparation des coupes pour le microscope électronique à transmission.....	144
2.5. Etude histo-pathologique du pancréas de cheval en état de choc sévère.....	144
2.5.1. Microscopie optique.....	145
2.5.2. Microscopie électronique à transmission.....	147
2.6. Discussion.....	149
C. Discussion générale, conclusions et perspectives	152
1. Discussion générale	152
2. Conclusions et perspectives	154
D. Bibliographie	155
Troisième Partie : Présentation systématique des résultats	160

Etude 1 :

Determination of a Gravity and a Shock Score for the Prognosis in Equine Surgical Colic.

Grulke S., Olle E., Detilleux J., Gangl M., Caudron I., Serteyn D.

J. Vet. Med. A, 2001, **48**, 465-473.....161

Etude 2 :

Etude rétrospective de 206 cas de pathologie chirurgicale intestinale chez le cheval :
incidence, diagnostic, pronostic et complications.

Grulke S., Gangl M., Caudron I., Serteyn D.

Ann. Méd. Vét., 2000, **144**, 319-328.....175

Etude 3 :

Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes.

Mathy-Hartert M., Bourgeois E., Grulke S., Deby-Dupont G., Caudron I., Deby C.,

Lamy M., Serteyn D.

Can. J. Vet. Res., 1998, **62**, 127-132.....197

Etude 4 :

Equine neutrophil myeloperoxydase in plasma : design of a radio-immunoassay
and first results in septic pathologies.

Deby-Dupont G., Grulke S., Caudron I., Mathy-Hartert M., Benbarek H.,

Deby C., Lamy M., Serteyn D.

Vet. Immunol. Immunopathol., 1998, **66**, 257-271.....212

Etude 5 :

Plasmatic myeloperoxidase level and polymorphonuclear neutrophil activation in horses suffering from large intestine obstruction requiring surgery.

Gulke S., Benbarek H., Caudron I., Deby-Dupont G., Mathy-Hartert M., Farnir F., Deby C., Lamy M., Ser-teyn D.

Can. J. Vet. Res., 1999, **63**, 142-147.....233

Etude 6 :

Plasma trypsin level in horses suffering from acute intestinal obstruction.

Gulke S., Gangl M., Deby-Dupont G., Caudron I., Deby C., Ser-teyn D.

In press Vet. J., 2002, **163**, 1-9.....248

Etude 7 :

Equine trypsin purification, radio-immunoassay and first results in intestinal obstruction.

Gulke S., Deby-Dupont G., Gangl M., Deby C., Ser-teyn D.

Soumis pour publication.....266

Etude 8 :

Pancreatic injury in equine acute abdomen evaluated by plasma trypsin activity and histo-pathology of pancreatic tissue.

Gulke S., Deby-Dupont G., Gangl M., Caudron I., Lamy M., Ser-teyn D.

Soumis pour publication.....286

Annexes

Liste des abréviations.....A

Liste des formules chimiques et symboles.....B

Liste des figures.....C

Liste des tableaux.....C

PREMIERE PARTIE

REVUE DE LA LITTERATURE

A. ASPECTS CLINIQUES DES OBSTRUCTIONS INTESTINALES AIGUËS

1. DIAGNOSTIC ET PRONOSTIC DES OBSTRUCTIONS INTESTINALES AIGUËS DU CHEVAL

Les pathologies abdominales aiguës sont une des premières causes de morbidité et de mortalité chez le cheval (Cohen *et al.*, 1995). Ces pathologies ont reçu une classification selon qu'elles soient digestives ou extra-digestives, médicales ou chirurgicales, aiguës ou chroniques, étranglées ou non-étranglées. Cette étude porte sur les pathologies du tractus digestif et surtout sur les pathologies chirurgicales, aiguës, obstructives, étranglées ou non.

1.1. Définition et classification des obstructions intestinales aiguës

L'obstruction intestinale peut être partielle ou totale et, en fonction du degré d'obstruction, l'évolution des signes cliniques (arrêt du transit, ballonnement, douleur) sera plus ou moins rapide. Dans la classe des obstructions non étranglées on retrouve essentiellement les impactions et les déplacements. Il n'y a pas d'interruption de la vascularisation et l'évolution, surtout l'apparition de l'état de choc, sera plus lente (Fig. 1a). Toutefois, la distension sévère des organes digestifs peut également provoquer des altérations de la micro-circulation (Dabareiner *et al.*, 1993) et de l'innervation. Ces phénomènes peuvent également être responsables d'un risque chirurgical majeur (Hackett, 1983) et entraîner des symptômes de choc (Allen et Tyler, 1990 ; Hofmeister *et al.*, 1998).

L'obstruction étranglée s'accompagne d'une perturbation de la vascularisation de l'intestin. On distingue l'incarcération (hernie étranglée interne), le volvulus, l'invagination et la torsion. Les lésions d'œdème, d'infarcissement et de nécrose intestinale se développent en quelques heures après le début des symptômes (White *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1988). La séquestration d'une grande quantité de fluides accompagnée d'une résorption d'endotoxines conduit au choc hypovolémique et endotoxique (Snyder, 1989 ; Moore et Bertone, 1992) (Fig. 1b). Suite à des lésions vasculaires (p. ex. thrombose artérielle d'origine parasitaire) des infarcissements non-obstrucifs peuvent également survenir. Suite à la perte de motricité de la

portion intestinale concernée, un arrêt du transit survient et la résorption d'endotoxines mène à un état de choc. Le tableau I détaille les pathologies existantes en fonction de la localisation et commente leur fréquence ou leurs conditions d'apparition (Serteyn *et al.*, 1994).

Fig. 1a Obstruction non étranglée du gros intestin.



1b Obstruction étranglée de l'intestin grêle.



1.2. Incidence, causes éventuelles et taux de survie des différentes obstructions

La fréquence des différents types de pathologies chirurgicales varie largement d'un centre vétérinaire à l'autre et peut être influencée par les habitudes alimentaires, la composition du sol et des aliments, les modes d'élevage, les races de chevaux, etc. présents dans une région donnée (Meyer, 1991).

Les taux de survie varient largement en fonction des pathologies abdominales aiguës mais ils sont toujours relativement plus faibles pour les coliques chirurgicales que pour les coliques médicales. Ils varient entre 26 % (Pearson *et al.*, 1971), 34 % (McCarthy et Hutchins, 1988 ; Ebert 1994a), 47,5 % (Ducharme *et al.*, 1983), 50 % (Pascoe *et al.*, 1983), 71 à 74 % (Huskamp, 1982; Becker et Breuer, 1985; Philips et Walmsley, 1993). L'amélioration des techniques d'anesthésie et de chirurgie, la meilleure connaissance de la pathogénie du choc et le traitement plus adéquat du choc préopératoire et post-opératoire expliquent en partie l'amélioration des taux de survie au cours des années. La reconnaissance sur le terrain de la pathologie chirurgicale et le transfert précoce en clinique est un autre élément favorisant la survie (Huskamp, 1973).

Tableau I Classification des principales obstructions intestinales et chirurgicales

Organes	Types d'obstruction	Pathologies	Commentaires
Intestin grêle	Obstruction non étranglée	plus rare	
		Impaction due aux ascaris	Suite à une vermifugation de poulains très parasités
		Adhérences	Obstruction souvent partielle suite à une péritonite
		Iléon et valvule iléo-cæcale	Impaction par aliments trop fibreux, épaissement de la paroi, parasites (p. ex. anoplocéphales)
		autres	Abcès, tumeurs, ...
	Obstruction étranglée	plus fréquente	
		Invagination	rare, surtout iléo-cæcale
		volvulus	Primaire, suite à une incarceration ou un vestige embryonnaire, entprend souvent une portion étendue
		incarcération	Foramen épiploïque, défauts de mésos, ligament large ou gastro-splénique, lors de vestiges embryonnaires
		Hernie étranglée	Inguinale, ombilicale, diaphragmatique
Cæcum, côlon replié	Obstruction non étranglée	Fréquente, évolution lente	
		Impaction sur corps étranger	Rare, jeunes chevaux
		Impaction par des aliments,	Traitement médical souvent efficace,
		Par du sable	Irritant pour la muqueuse
		Entérolithe	Parfois palpé par fouiller rectal
		Déplacement du côlon replié gauche	<ul style="list-style-type: none"> ➤ vers le haut et vers la droite ➤ accrochement néphro-splénique ➤ rétroflexion anse pelvienne
		Torsion non étranglée (< 270°)	Côlon gauche ou ensemble du côlon replié
	Obstruction étranglée	Plus rare, évolution très rapide	
		invagination	Cæco-caecal ou cæco-colique, évolution plus lente car obstruction partielle et portion ischémique dans l'organe
		Torsion du cæcum	Associée à une torsion du côlon
		Torsion du côlon	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 270° pour avoir une altération vasculaire ➤ anse pelvienne, côlon ventral et dorsal gauches, tout le côlon avec ou sans cæcum
		Volvulus (torsion du mésocôlon)	Tout le côlon et cæcum
	Côlon flottant	Obstruction non étranglée	Absence de selles, ténésme, ballonnement sévère si obstruction complète
Impaction par des aliments			Traitement médical plus fréquent
Entérolithe, corps étranger			Peut être palpé par fouiller rectal
Obstruction étranglée		Ténésme fréquent	
		Incarcération, volvulus, hernie inguinale	Pathologie rare car méso court

1.2.1. Intestin grêle

1.2.1.1. Impaction de l'iléon

L'impaction de l'iléon représente de 0,5 à 10,8 % des cas de coliques chirurgicales et semble fortement influencée par l'ingestion d'une alimentation très riche en fibres. Dans certains cas, l'influence de vers plats ou un épaissement de la musculature de l'iléon peuvent également être incriminés (Embertson *et al.*, 1985 ; Kersjes *et al.*, 1988 ; Hanson *et al.*, 1998).

1.2.1.2. Incarcération dans le foramen épiploïque

Cette obstruction étranglée de l'intestin grêle représente de 1,6 à 8 % des cas (Walmsley, 1991 ; Huskamp, 1982). L'incarcération se fait (le plus souvent) de la gauche vers la droite en repoussant le sac de l'épiploon ou moins souvent à l'inverse en se logeant dans le sac épiploïque. La portion intestinale concernée peut ne mesurer que quelques centimètres, ne concerner que le bord anti-mésentérique ou atteindre la quasi totalité de l'intestin grêle. L'iléon semble le plus souvent atteint mais quelques cas isolés d'incarcération de la courbure pelvienne sont également décrits (Foerner *et al.*, 1993 ; Steenhout *et al.*, 1993). Le taux de survie varie de seulement 15 % à environ 60 % (Turner *et al.*, 1984 ; Engelbert *et al.*, 1993 ; Vachon et Fischer, 1995).

1.2.1.3. Etranglement par un lipome pédonculé

L'étranglement d'une anse d'intestin grêle (plus rarement du côlon flottant) par un lipome pédonculé apparaît toujours chez des chevaux âgés. Le lipome peut rester asymptomatique mais lorsque son pédoncule entoure une anse intestinale, les douleurs sont souvent sévères et la nécrose intestinale s'installe rapidement. Son incidence est de seulement 2,6 % de tous les cas de coliques (Blikslager *et al.*, 1992).

1.2.1.4. Hernie inguinale étranglée

La hernie inguinale étranglée survient généralement chez l'étalon suite à un effort. Cette hernie est généralement directe et non-réductible. Le pronostic est amélioré par le fait que le

diagnostic est aisé et l'envoi en clinique précoce (environ 75 % de survie) (Schneider *et al.*, 1982 ; Gluntz *et al.*, 1998).

1.2.1.5. Volvulus de l'intestin grêle

Le volvulus de l'intestin grêle se présente plus fréquemment chez des jeunes chevaux et entreprend souvent une très grande partie de l'intestin grêle. Il peut être secondaire à un problème de motricité, à un point fixe, à une attache mésentérique anormale (vestige embryonnaire), mais parfois aucune anomalie n'est observée. Le taux de survie est très faible à cause de l'étendue de la portion intestinale atteinte (Gluntz, 1999).

1.2.1.6. Autres

Parmi les hernies étranglées il faut encore signaler la hernie ombilicale étranglée et la hernie diaphragmatique. Il y a également d'autres types d'incarcérations comme l'incarcération dans un défaut du mésentère (Gayle *et al.*, 2000), du ligament large ou du repli cæco-colique (Gayle *et al.*, 2001) ainsi que l'entrapement néphro-splénique de l'intestin grêle (Goodrich *et al.*, 1997).

1.2.2. Gros intestin

1.2.2.1. Impaction du gros intestin

L'impaction du gros intestin représente 13,4 % des cas de coliques référés en clinique dans un bilan de Dabareiner et collaborateurs (1995). Elle se localise préférentiellement à la courbure pelvienne. C'est une affection dont le traitement est le plus souvent médical, mais dans 16,3 % des cas une intervention chirurgicale est nécessaire étant donné l'absence de réponse aux traitements médicamenteux. Les cas opérés ont un taux de survie nettement inférieur aux cas médicaux (Dabareiner *et al.*, 1995).

1.2.2.2. Entérolithes

Les entérolithes peuvent se loger au niveau du côlon replié, transverse ou descendant. Leur incidence est très variable : 0,8 % de toutes les coliques d'après Huskamp (1982) à 2,4 %

d'après Tennant et collaborateurs (1972). A cause de la composition du sol, en Californie leur pourcentage représente 15,1 % des coliques et même 27,5 % des coliques chirurgicales (Hassel *et al.*, 1999). Les entérolithes se composent en général de phosphate d'ammonium et de magnésium autour d'un noyau central le plus fréquemment formé par un petit corps étranger (Murray *et al.*, 1992).

1.2.2.3. Déplacements du côlon replié

Les déplacements du côlon replié concernent surtout les portions gauches et présentent en général le pronostic le plus favorable avec 75 à 80 % de survie. Différents types de déplacements existent mais malheureusement les dénominations ne sont pas toujours claires ni identiques d'un bilan à l'autre.

- accrochement néphro-splénique 9 % des coliques dans un bilan de 542 cas (Hofmeister *et al.*, 1998).
- déplacement vers le haut et vers la droite, environ 5,7 % des coliques (Huskamp et Kopf, 1983).
- torsion non étranglée, 14 % des coliques chirurgicales (Hackett, 1983).
- rétroflexion de la courbure pelvienne

1.2.2.4. Pathologie cæcale primaire

La pathologie cæcale primaire semble rare (3,7 % des cas de coliques) et la torsion encore plus. Le taux de survie est variable et peu favorable, car la rupture du cæcum survient fréquemment (Dart *et al.*, 2000).

L'invagination cæco-cæcale ou cæco-colique présente une faible incidence aussi (seulement 1,3 % des cas de coliques chirurgicales). La différence entre les taux de survie faibles (27,3 % : Gaughan et Hackett, 1990) ou plus élevés (62,5 % : Martin *et al.*, 1999) pourrait être due à l'impossibilité de réduire l'invagination ou à l'atteinte vasculaire de la base du cæcum qui rend le cas inopérable par des techniques classiques.

1.2.2.5. Torsion ou volvulus du côlon replié

Cette obstruction étranglée représente 11 à 17 % des cas chirurgicaux (Sherman, 1996; Snyder *et al.*, 1989 ; Snyder *et al.*, 1990). Son taux de survie est variable et dépend du degré de torsion et de l'intervalle entre le début des symptômes et le traitement chirurgical. Des taux de survie de 22,5 % pour des torsions de plus de 270° (Harrison, 1988) à environ 35 % (Barclay *et al.*, 1980; Harrison, 1988 ; Hughes et Slone, 1997) sont mentionnés. Les torsions de moins de 270° ou celles qui durent depuis moins de 2 heures ont un taux de survie amélioré (Snyder *et al.*, 1989 ; Hughes et Slone, 1997). Toutefois, une si faible durée des symptômes semble irréaliste parce que, de la découverte du cheval en coliques jusqu'à l'intervention dans une clinique spécialisée, le temps dépasse généralement et largement les deux heures.

1.2.2.6. Pathologies du côlon flottant

Les pathologies du côlon flottant représentent de 3 à 18 % de tous les cas de coliques d'après une étude de Keller et Horney (1985). Dans un bilan de Dart et collaborateurs (1992), sur 102 cas de pathologies du côlon flottant, environ 70 % sont des obstructions non étranglées avec des entérolithes, des impactions, des coprolithes ou des corps étrangers. Ils dénombrent aussi 11 % de lipome pédonculé, 2 % de volvulus et d'accrochement néphro-splénique. Sur 63 chevaux opérés 10 ont du être euthanasiés sur la table et 5 en post-opératoire. Cela correspond à un taux de survie 76 % (Dart *et al.*, 1992).

1.3. Moyens de diagnostic

Les méthodes de diagnostic de l'obstruction intestinale aiguë ainsi que les critères intervenant dans la décision d'un traitement chirurgical par rapport à un traitement médical ont été largement discutées dans la littérature. Le diagnostic se base en général sur le fouiller rectal (Puotunen-Reinert et Huskamp, 1985), mais aussi sur la présence de reflux gastrique et sur l'aspect du liquide de la paracentèse abdominale (Kopf et Huskamp, 1978). Toutefois, il faut tenir compte des signes de douleur, de la distension abdominale extérieure, des autres paramètres de l'examen général, (Huskamp, 1973) et des paramètres du bilan sanguin. Le fouiller rectal semble être l'élément le plus important dans la décision et le diagnostic (Ducharme *et al.*, 1989 ; Reeves *et al.*, 1991), mais en général d'autres paramètres entrent aussi en ligne de compte (Kopf et Huskamp, 1978).

D'autres examens complémentaires comme la radiographie abdominale et l'échographie trans-abdominale peuvent apporter des éléments de décision lorsqu'il est impossible de recourir au fouiller rectal (poulain ou poney de taille réduite) ou lorsque le fouiller ne donne pas de résultat par exemple, lors d'un problème très antérieur. L'échographie est surtout décrite pour le diagnostic de l'accrochement néphro-splénique (Santschi *et al.*, 1993) même si dans ce cas le fouiller rectal est généralement suffisant pour poser le diagnostic précis. Elle sera utile lors de distension gazeuse importante, chez des juments gestantes ou chez des poneys de taille réduite. En cas d'incarcération de l'intestin grêle dans le foramen épiploïque (Vachon et Fischer, 1995) ou pour d'autres pathologies obstructives et étranglées de l'intestin grêle (Klohn *et al.*, 1996), l'échographie trans-abdominale peut également détecter de façon plus précoce la distension, l'œdème et l'absence de motricité des anses intestinales grêles.

1.4. Pronostic

Etant donné le faible taux de survie et l'importance de l'investissement financier à consentir pour de telles chirurgies, l'évaluation du pronostic lors de l'admission est d'une importance majeure. Diverses études ont donc été menées afin d'évaluer la valeur pronostique de paramètres individuels d'ordre cliniques ou biochimiques. L'apparition de l'état de choc est souvent le signe d'une ischémie intestinale ce qui aggrave fortement le pronostic.

1.4.1. Paramètres individuels

Les paramètres évaluant le système cardio-vasculaire sont le plus couramment utilisés. Les données cliniques sont la fréquence cardiaque, l'intensité du pouls, la couleur des muqueuses et le temps de remplissage capillaire ainsi que la fréquence respiratoire (Parry *et al.*, 1983a ; Puotunen-Reinert, 1986 ; Ebert, 1994b). Les examens complémentaires les plus importants s'avèrent être l'hématocrite, la concentration en lactates et en urée, la pression artérielle systolique (Parry *et al.*, 1983b) mais aussi le déficit en anions (Bristol, 1982). Certains critères cliniques ne concernant pas le système cardio-vasculaire comme l'intensité des signes de colique (Puotunen-Reinert, 1986) et l'état de dépression mentale (Parry *et al.*, 1983a), sont également significatifs pour l'évaluation du pronostic. Toutefois les avis divergent sur certains paramètres. Ebert ne trouve pas de différence significative de la pression artérielle systolique

entre les survivants et les non survivants (Ebert, 1994b) alors que d'autres (Gay *et al.*, 1977 ; Parry *et al.*, 1983b) voient une variation significative et la jugent comme le paramètre le plus significatif. Ces différences d'observation peuvent être dues à un faible échantillon de cas. Certains paramètres comme la fréquence cardiaque ou l'hématocrite présentent une grande variabilité, au point que les valeurs des chevaux survivants et non-survivants se recoupent largement et que, parfois, un cheval survivant présente la valeur la plus élevée (un cheval avec 80 % d'hématocrite est parmi les survivants [Puotunen-Reinert, 1986]). Ceci peut être dû au fait que des facteurs autres que l'état de choc peuvent influencer la fréquence cardiaque ou l'hématocrite. Ils peuvent être augmentés par le stress du transport, les manipulations et la douleur due à la colique ou diminués par certains médicaments.

D'autres auteurs enfin tiennent compte du liquide de paracentèse abdominale, soit de son aspect macroscopique et de sa densité (Freden *et al.*, 1998), soit de son contenu en protéines totales (Allen *et al.*, 1986 ; Furr *et al.*, 1995). Mais si l'évaluation du liquide péritonéal peut avoir une valeur pronostic intéressante, il ne peut pas toujours être prélevé. La distension abdominale sévère, l'agitation à cause d'une douleur importante, l'abondance de graisse entre la paroi musculaire et le péritoine etc. sont plusieurs causes d'échec dans l'obtention du liquide péritonéal. En outre, la ponction d'un vaisseau sanguin ou d'un intestin peut fausser les résultats.

1.4.2. Paramètres combinés

Etant donné qu'il n'y a pas de paramètre unique qui établit un pronostic exact, l'analyse de régression logistique est utilisée par plusieurs auteurs afin de choisir les paramètres les plus significatifs qui, ensemble, donnent le pronostic le plus exact (Parry *et al.*, 1983b ; Orsini *et al.*, 1988 ; Reeves *et al.*, 1988 et 1989 ; Ebert, 1995 ; Furr *et al.*, 1995). Un autre problème est le manque de données dû à la violence des douleurs et à la situation d'urgence. Afin de pallier à ce problème une étude récente utilise une combinaison de paramètres cliniques et hématologiques simples afin d'établir un pronostic. Il s'agit de la température rectale, du degré de douleur abdominale, du temps de remplissage capillaire et de l'hématocrite. On base donc le pronostic sur une combinaison de paramètres qui évaluent l'état de choc et le degré d'obstruction intestinale (Thoenner *et al.*, 2000). La température rectale semble peu significative pour l'évaluation du pronostic en cas de coliques chirurgicales. L'administration de certains traitements, comme la flunixin méglumine qui ralentit fortement l'évolution des

signes de choc, peut également fausser l'évaluation de l'état cardio-vasculaire du cheval. Dans certains cas, les chevaux ne montrent que peu de signes de choc malgré la présence de lésions intestinales sévères. Des critères cliniques qui mesurent seulement le degré d'obstruction intestinale devraient être testés pour voir s'ils peuvent également aider à poser un pronostic.

2. TRAITEMENTS ET COMPLICATIONS DES OBSTRUCTIONS INTESTINALES AIGUËS

2.1. Traitement chirurgical

2.1.1. Traitement médicamenteux préopératoire

La majorité des auteurs conseille un traitement préopératoire à base d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens, par exemple la flunixin méglumine à raison de 1,1 mg/kg par voie intraveineuse, et une antibiothérapie de Pénicilline (22.000 UI/kg) combiné à la Gentamicine (6,6 mg/kg) par voie intraveineuse également (Belknap et Baxter, 1992; Hardy et Bertone, 1992). En fonction de la présence et de la sévérité d'un état de choc hypovolémique ou endotoxique, des perfusions sont également administrées. En cas d'état de choc et de déshydratation, il faut régulièrement recourir aux perfusions hypertoniques (NaCl à 7,2 %, 3-5 mL/kg), afin de diminuer le volume de perfusions et donc le temps nécessaire à leur administration. Ceci est utile lors de laparotomie d'urgence ou quand le cheval est très agité. Ces perfusions doivent être suivies par des solutions isotoniques (Moore et Bertone, 1992; Van Hoogmoed et Snyder, 1997).

2.1.2. Types de laparotomies et approches chirurgicales

La grande majorité des cas de laparotomies d'urgence est réalisée sous anesthésie générale en décubitus dorsal par une approche via la ligne blanche. Cette approche permet la meilleure exploration, la visualisation et même l'extériorisation du jéjunum, d'une partie de l'iléon, du cæcum, d'une grande partie du côlon replié et du côlon flottant. D'autres structures

peuvent être palpées comme p. ex. l'estomac, le duodénum, la valvule iléo-cæcale, la base du cæcum et du côlon replié, le côlon transverse et le rectum (White, 1990). D'autres approches existent (para-médiane, par le flanc, para-costale, résection de la 17^{ième} ou 18^{ième} côte) mais ne sont pas couramment utilisées étant donné le manque de possibilités d'exploration de l'ensemble de la cavité abdominale (Ducharme *et al.*, 1992).

2.1.2.1. Exploration abdominale et décompression

Une exploration systématique de la cavité abdominale en partant du cæcum est réalisée (White, 1990) en suivant le ligament iléo-cæcal afin de retrouver la valvule iléo-cæcale et de tester sa perméabilité en massant du contenu iléal vers le cæcum. Ce massage du contenu intestinal permet également de décompresser et de diminuer la pression intra-luminale responsable de perturbations de la micro-circulation de la paroi de l'intestin grêle. L'intestin grêle peut ainsi être complètement exploré. La présence de portions vides et distendues est le signe d'une obstruction. La position du gros intestin est vérifiée en palpant la direction du ligament cæco-colique et en suivant une bande charnue du côlon replié jusqu'à la courbure pelvienne. Si le côlon ventral est en bonne position, le côlon dorsal l'est forcément. En cas de tympanisme du gros intestin, l'aspiration des gaz permet sa décompression. Cette intervention est suivie d'un repositionnement de l'intestin (Belknap et Baxter, 1992).

2.1.2.2. Types d'entérectomies et d'entérotomies

Etant donné que la majorité des obstructions de l'intestin grêle sont étranglées, une entérectomie ou procédure de « by-pass » s'impose souvent (Beard et Bertone, 1992). Différentes techniques sont utilisées en fonction de la localisation de l'obstruction : suture manuelle ou automatique, anastomose « end-to-end » ou « side-to-side » (Pascoe et Peterson, 1989 ; Baxter *et al.*, 1992 ; Beard et Bertone, 1992). L'atteinte de l'iléon et de la région irriguée par l'artère rétrograde iléo-colique nécessite une nouvelle anastomose jéjuno-cæcale (de type « end-to-side » ou « side-to-side ») (McIlwraith et Turner, 1987 ; Beard et Bertone, 1992).

Les obstructions intra-luminales du gros intestin par des aliments, des entérolithes ou du sable demandent une vidange du contenu via une entérotomie pratiquée au niveau du bord anti-mésentérique de la courbure pelvienne (Hardy et Bertone, 1992). En cas d'obstructions

étranglées ou de lésions thrombo-emboliques, on peut pratiquer une entérectomie du côlon replié jusqu'au niveau du repli cæco-colique (Bertone *et al.*, 1986 ; Hughes et Slone, 1998). Toutefois, en cas d'atteinte vasculaire du repli cæco-colique voire de l'ensemble du cæcum, aucune possibilité de résection de la portion nécrosée n'est envisageable. Le diagnostic précoce et le repositionnement rapide représentent la seule chance de survie du cheval. Les pathologies du cæcum peuvent nécessiter une typhlotomie afin de vidanger l'organe. Afin de faciliter la vidange du cæcum une anastomose cæco-colique au niveau de la base du cæcum peut être créée. Une anastomose jéjuno-colique peut complètement court-circuiter le cæcum en cas d'impaction chronique (Ross et Hanson, 1992 ; Gerard *et al.*, 1996). Lors de torsion du cæcum ou d'invagination cæco-cæcale ou cæco-colique divers auteurs ont réalisée une typhlectomie partielle (Gaughan et Hackett, 1990 ; Martin *et al.*, 1999 ; Dart *et al.*, 2000) parfois associée à une colotomie lorsque l'invagination était difficile à réduire. En cas d'impossibilité de réduction de l'invagination, un auteur a réalisé une anastomose jéjuno-colique tout en laissant le moignon invaginé en place (Ward et Fubini, 1994).

Pour les chirurgies du côlon flottant, il est conseillé d'éviter les entérotomies et de procéder au massage avec l'aide d'un lavement rectal afin d'évacuer les matières via l'anus ou si cela est impossible de les amener au niveau du gros intestin et de les évacuer par une entérotomie de la courbure pelvienne. Si toutefois une entérotomie du côlon flottant s'avère indispensable, elle se réalise au niveau de la courbure anti-mésentérique sur la bande charnue. Les entérectomies sont en général de type « end-to-end » avec suture manuelle en deux couches, mais le mésentère court peut empêcher certaines résections (Hanson *et al.*, 1988a et b). La vidange du côlon replié est conseillée afin de faciliter la cicatrisation, parce que le passage de crottins à l'endroit de l'anastomose pourrait induire des douleurs abdominales voire provoquer le lâchage des sutures.

2.2. Anesthésie

Le risque de mortalité en cas d'anesthésie en urgence (2-4,3 %) est nettement plus élevé que pour des chirurgies de convenance chez des chevaux sains (0,63 %). Ce risque est encore augmenté (10x) lors de chirurgies abdominales à cause des déséquilibres cardiovasculaires et respiratoires (Mee *et al.*, 1998a et b ; Johnston, 2000). Il est difficile d'établir avec certitude le pourcentage de mortalité directement lié à l'anesthésie car divers cas ont été euthanasiés suite

à des lésions inopérables etc. Les complications qui surviennent lors des anesthésies semblent plus liées aux pathologies qu'aux types de protocoles d'anesthésie utilisés (Trim *et al.*, 1989). Etant donné la situation d'urgence et l'état général très différent d'un cas à l'autre, il est difficile d'établir des protocoles d'anesthésie qui réduiraient les complications liées à l'anesthésie. L'agent de prémédication reste la xylazine parfois associée aux morphiniques. L'induction est généralement réalisée avec du guaiacolate de glycérol éther associé à des barbituriques ou de la kétamine. L'anesthésique volatil utilisé pour la maintenance est l'halothane ou l'isoflurane. Toutefois, étant donné les perturbations cardio-vasculaires et respiratoires, un protocole adapté à ces conditions pourrait améliorer la qualité de l'anesthésie et diminuer les risques lors du réveil.

2.3. Soins post-opératoires

Les soins post-opératoires jouent un rôle majeur. Ils permettent de détecter les complications de façon précoce et de les traiter avant qu'elles ne conduisent à une morbidité ou une mortalité alors que le problème primaire est résolu (Hunt *et al.*, 1986 ; McCarthy et Hutchins, 1988 ; Baxter, 1992).

L'antibiothérapie à large spectre est conseillée. C'est généralement une association de Pénicilline/Gentamicine qui est utilisée mais la durée du traitement varie fortement : de seulement 3 à 5 jours (Baxter, 1992) jusque 4 à 6 semaines dans certains cas (Ward et Fubini, 1994). Un traitement analgésique et anti-inflammatoire avec de la flunixin méglumine (1,1 mg/kg) est en général administré avant, pendant ou juste après l'intervention. Des doses de 0,25 mg/kg/8h à 1,1 mg/kg 1-2x/j sont données par la suite. Jusqu'au rétablissement du transit digestif des perfusions sont administrées afin de rétablir l'équilibre hydrique, ionique et acido-basique. Le type de fluide utilisé est en général du Ringer-lactate à des débits de 1-2 L/h/450 kg (Freeman *et al.*, 2000). D'autres traitements préventifs sont administrés comme par exemple l'héparine contre le risque de fourbure (Hunt *et al.*, 1986) et la formation d'adhérences ou des stimulants de la motricité intestinale dans les cas d'obstruction de l'intestin grêle afin d'éviter l'iléus paralytique post-opératoire (Snyder et Van Hoogmoed, 2000). L'alimentation ne doit être réintroduite que très progressivement. Certains auteurs conseillent de ne donner que de l'eau pendant les premières 48 heures (Hunt *et al.*, 1986) alors que d'autres donnent de l'herbe

ou du foin par petites poignées dès 6 heures après l'intervention afin de stimuler le transit digestif (Snyder et Van Hoogmoed, 2000).

2.4. Complications post-opératoires et leur traitement

Les complications les plus fréquemment citées par la majorité des auteurs sont le choc hypovolémique et endotoxique, l'iléus paralytique post-opératoire, la péritonite et les adhérences intra-abdominales, les complications de plaie abdominale et la fourbure (Hunt *et al.*, 1986 ; Baxter, 1989 ; Moore et Bertone, 1992). Toutefois la fréquence des différentes complications est très variable d'une étude à l'autre, ce qui peut être dû aux types de pathologies et aux traitements administrés. Etant donné la complexité de l'état de choc, sa pathogénie sera discutée plus loin.

2.4.1. Iléus paralytique post-opératoire

2.4.1.1. Fréquence

L'iléus paralytique post-opératoire représente une complication d'importance majeure pour plusieurs auteurs et ce, en particulier, pour l'iléus paralytique fonctionnel de l'intestin grêle. Dans un bilan l'incidence est de 43 % avec un taux de mortalité très élevé (86 %) (Hunt *et al.*, 1986). Un bilan plus récent donne une incidence moins importante de ± 21 %, avec une mortalité de seulement 13 %. Ceci illustre le progrès réalisé dans la compréhension des mécanismes pathogènes de l'iléus même si le phénomène n'est toujours pas complètement élucidé (Snyder et Van Hoogmoed, 2000).

2.4.1.2. Motricité intestinale normale et pathogénie de l'iléus

L'activité électrique à la base de la motricité intestinale est divisée en trois phases. La phase 1 est l'activité électrique de base, la phase 2 présente des activités en pic surajoutés qui donnent des contractions individuelles. Accessoirement, on observe une phase 3 qui est le complexe migrant myoélectrique. Il ne dure que 10 à 20 secondes et n'est pas associé à la progression normale des aliments. Il existe deux centres « pacemakers » gastro-intestinaux dont le premier est situé au niveau de l'antrum gastrique et le deuxième au niveau du cæcum. Le

premier régule la coordination entre l'estomac et le duodénum. La perte de cette régulation pourrait être à la base de l'iléus paralytique post-opératoire. Le deuxième « pacemaker » est responsable du passage des aliments du cæcum vers le côlon ventral droit (Ross *et al.*, 1986).

Plusieurs niveaux de régulation influencent la motricité intestinale. Le système nerveux extrinsèque parasympathique est surtout stimulateur alors que le système nerveux sympathique est surtout inhibiteur. Le système nerveux entérique fait partie du système nerveux intrinsèque et est formé de deux types de plexus. Les plexus myentériques d'Auerbach se localisent entre les deux couches musculaires (longitudinale et circulaire) alors que les plexus de Meissner se logent dans la sous-muqueuse (Gerring, 1991). De récentes études ont montré une densité plus faible de ces plexus myentériques au niveau du gros intestin chez des chevaux atteints de torsion du côlon (Schusser et White, 1997).

Divers neurotransmetteurs sont impliqués dans la motricité intestinale. Le neurotransmetteur principal du système nerveux intrinsèque est l'acétylcholine (AC). Elle agit sur des récepteurs nicotiques au niveau de la jonction ganglionnaire et sur des récepteurs muscariniques au niveau de la jonction neuromusculaire. Il existe également des récepteurs de motilin. Leur nombre diminue du duodénum vers le jéjunum, l'anse pelvienne et le cæcum (Koenig *et al.*, 2001). Le monoxyde d'azote (NO^{*}), l'adénosine nucléotide triphosphate (ATP) et divers neuropeptides dont le peptide vasoactif intestinal (VIP) jouent essentiellement un rôle inhibiteur. La substance P, un autre neuropeptide, augmente l'activité contractile par un effet direct ou via l'augmentation du relargage d'AC (Rakestraw *et al.*, 1996 ; Van Hoogmoed, 2000).

Un tonus sympathique excessif, via une activation des récepteurs alpha-2 et une inhibition de l'AC par la norépinéphrine, est également incriminé dans le développement de l'iléus. Les endotoxines présenteraient également un effet inhibiteur de la motricité intestinale via la stimulation de la production de prostaglandine E₂ par les macrophages (King et Gerring, 1991).

2.4.1.3. Facteurs prédisposant

L'iléus est parfois facilement expliqué lorsqu'une torsion subsiste, que l'intestin nécrosé est laissé en place, qu'une anastomose n'est pas perméable ou qu'une adhérence empêche le

transit. L'iléus idiopathique, par contre, est purement fonctionnel et est plus difficile à comprendre. La complexité de la motricité intestinale rend le traitement difficile. Les facteurs prédisposant à l'iléus paralytique sont l'atteinte de l'intestin grêle, la distension intestinale, les phénomènes d'ischémie – reperfusion, la manipulation en chirurgie, l'état de choc endotoxique et les résections et anastomoses (Blikslager *et al.*, 1994 ; Snyder et Van Hoogmoed, 2000).

2.4.1.4. Traitement

Le traitement est pluriel, car divers facteurs entrent en jeu. La décompression de l'intestin et la résection de toute portion non viable est indispensable pendant la chirurgie. Les traitements à base de perfusion sont essentiels pour rétablir l'équilibre hydrique, ionique et acido-basique. Toutefois, des perfusions trop abondantes devraient être évitées car elles contribueraient à l'œdème et à la formation de reflux gastrique. Le retrait du reflux gastrique en routine est conseillé afin d'éviter la distension et la rupture de l'estomac. La distension des organes induit de la douleur et risque d'augmenter le tonus sympathique. Un autre auteur par contre n'effectue le sondage naso-gastrique qu'en cas de signe de douleur ou d'augmentation de la fréquence cardiaque et non de routine. Il n'utilise pas de traitements stimulant la motricité en routine par contre il donne rapidement après l'intervention (12 – 18 heures) de petites quantités d'eau et des poignées de foin (Freeman *et al.*, 2000). L'alimentation peut influencer favorablement le transit digestif. Des études en médecine humaine ont montré une augmentation de la morbidité voire même un retard du retour du fonctionnement intestinal normal suite aux sondages répétitifs de routine (Cheadle *et al.*, 1985 ; Cheatham *et al.*, 1995). Il est également conseillé de faire marcher le cheval plusieurs fois par jour (Hunt *et al.*, 1986). D'autres auteurs par contre conseillent l'utilisation de médicaments stimulant la motricité dans tous les cas à risque d'iléus paralytique post-opératoire (Snyder et Van Hoogmoed, 2000).

En ce qui concerne ces traitements, diverses molécules existent mais aucune ne présente une efficacité dans tous les cas et les effets secondaires sont parfois très importants. Des stimulants cholinergiques comme la néostigmine (inhibiteur de la cholinestérase) et le bétanécotol (agoniste cholinergique) sont surtout efficaces au niveau du gros intestin et sont en général administrés par voie sous-cutanée. Toutefois, certaines études montrent un retard de la vidange gastrique induit par la néostigmine (Adams et McHarg, 1985) alors que d'autres la conseillent même pour l'iléus de l'intestin grêle (Huskamp, 1982).

On peut utiliser des benzamides tels que le métoclopramide et le cisapride (benzamide substituée). Le métoclopramide présente un effet antagoniste au niveau des récepteurs de dopamine et alpha-2 et stimule la libération d'AC mais il présente malheureusement beaucoup d'effets secondaires (excitation, sudation). Le cisapride n'a pas d'effet au niveau des récepteurs dopamines et stimule seulement la libération d'AC des neurones post-ganglionnaires des plexus myentériques (Gerring, 1991). Il a beaucoup moins d'effets secondaires. Il stimule la motricité de l'ensemble du tube digestif et coordonne l'activité gastro-duodénale à de faibles doses comme 0,1 mg/kg (IV), ce qui semble se confirmer cliniquement (Gerring, 1991; Gerring *et al.*, 1991). Il doit être administré par voie parentérale mais n'existe pas sous cette forme galénique en Belgique. L'administration entérale demande des doses dix fois plus élevées (1 mg/kg).

L'érythromycine, antibiotique macrolide, active les récepteurs de motilin des muscles lisses et stimule la libération d'AC. Les doses administrées varient de 0,5 à 2,2 mg/kg/h par voie intraveineuse. Des doses plus importantes auraient un effet feedback négatif (diminution du nombre de récepteurs) (Van Hoogmoed, 2000).

La lidocaïne peut être utilisée comme stimulant de la motricité car elle inhibe le tonus sympathique et active directement le muscle lisse. Elle réduirait l'inflammation via une suppression des cytokines et une inactivation des leucocytes entraînant une diminution de leur migration (Van Hoogmoed, 2000).

Certains auteurs parlent d'un effet réducteur de la motricité intestinale de l'acépromazine ce qui provoquerait une distension de l'intestin (Gerring, 1991) alors que d'autres la conseillent comme inhibiteur du sympathique (antagoniste des récepteurs alpha adrénergiques) (Snyder et Van Hoogmoed, 2000).

2.4.2. Péritonite

2.4.2.1. Fréquence

L'incidence de la péritonite varie selon les bilans. Certains ne la mentionnent même pas comme complication (Hunt *et al.*, 1986) alors que, pour d'autres auteurs, elle est la cause majeure de mortalité (Philips et Walmsley, 1993).

2.4.2.2. *Symptômes et diagnostic*

Les symptômes sont des douleurs abdominales, de la fièvre, de l'anorexie, de l'abattement, une diminution de la motricité intestinale, de la diarrhée et, dans des cas chroniques, une perte de poids (Dyson, 1983 ; Mair *et al.*, 1990 ; Baxter, 1992). Etant donné l'absence de symptôme pathognomonique pour le diagnostic de la péritonite post-opératoire, les critères de classification sont variables.

L'évaluation du liquide péritonéal semble être un moyen de diagnostic fiable. Le taux normal de leucocytes dans le liquide péritonéal est de l'ordre de 500 – 5000/ μ L avec un pourcentage d'environ 50 % de neutrophiles (PMN). Il n'y a pas de fibrinogène, la densité spécifique est de 1000 à 1015 et les protéines totales de 0,5 à 1,5 g/dL (Nelson, 1979). Mais la laparotomie exploratrice seule sur des chevaux sains provoque déjà une réaction inflammatoire importante avec une augmentation spectaculaire des leucocytes et une augmentation du pourcentage des PMN après 24 h (130 – 160000/ μ L avec 91 % de PMN). Ce taux diminue progressivement à partir de 3 voire 5 jours post-opératoires mais il reste au delà de la normale 6 à 7 jours plus tard (40 – 45000/ μ L) (Santschi *et al.*, 1988 ; Hanson *et al.*, 1992). Le taux de leucocytes n'est pas significativement différent entre des chevaux ayant eu une laparotomie exploratrice seule ou une entérectomie du côlon flottant. Par contre, la différence en érythrocytes est significative entre les deux groupes (Hanson *et al.*, 1992). Pour ces raisons, l'attitude clinique, la présence de fièvre et de signes de coliques doivent être considérés. Un suivi régulier des leucocytes sanguins (leucopénie puis leucocytose) et du liquide péritonéal peut permettre de faire la différence entre la réponse physiologique normale vis-à-vis d'une laparotomie et l'évolution pathologique. Un examen cytologique plus détaillé est généralement nécessaire afin de détecter le pourcentage des PMN et leur aspect (dégénérés ou non). Le noyau des PMN peut présenter une pycnose, une karyolyse ou un karyorrhaxis. La présence de bactéries intra- voire extracellulaires indique une réaction inflammatoire septique importante et un pronostic de plus en plus défavorable (Adams *et al.*, 1980).

La surface importante que représente le péritoine, fait que la réponse inflammatoire exsudative massive peut entraîner des perturbations hémodynamiques majeures et une déshydratation sévère. L'innervation du péritoine pariétal, explique les signes spécifiques de douleur abdominale (ventre de bois) en cas de péritonite (Mair *et al.*, 1990).

2.4.2.3. Traitement

Le traitement de la péritonite consiste en général en une antibiothérapie à large spectre accompagnée d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens, d'analgésiques et de fluides par voie intraveineuse en cas de perturbations cardio-vasculaires. Des irrigations ou lavages péritonéaux sont conseillés par certains auteurs afin de retirer les microorganismes, les débris cellulaires, les enzymes et les toxines et afin de diminuer la formation d'adhérences (Valdez *et al.*, 1979). Mais d'autres auteurs ont traité avec succès des chevaux souffrant de péritonite septique sans irrigation péritonéale (Dyson, 1983 ; Mair *et al.*, 1990). Etant donné la diversité des cas cliniques et des traitements instaurés, il est difficile d'objectiver l'effet de l'un ou l'autre traitement. Toutefois, certains antiseptiques, comme l'isobétadine dermique, semblent contre-indiqués car, chez les chevaux sains, ils provoquent une péritonite chimique, hémorragique et diffuse. La même étude a montré qu'une solution isotonique de NaCl additionnée d'antibiotiques ou non ne provoque qu'une légère inflammation transitoire éventuellement due à la température ou à l'acidité de l'eau physiologique (Schneider *et al.*, 1988).

2.4.3. Adhérences abdominales

2.4.3.1. Incidence

L'inflammation péritonéale intervient aussi à plus long terme dans la morbidité et la mortalité suite à la formation d'adhérences. Divers bilans citent une incidence d'adhérences s'élevant de 14 à 26 % (Baxter *et al.*, 1989 ; McDonald *et al.*, 1989 ; Philips et Walmsley, 1993). Ce pourcentage est probablement sous-estimé car les adhérences ne provoquant pas de récurrence de coliques ne sont pas répertoriées.

En médecine humaine, la fréquence élevée des laparotomies permet des bilans nettement plus vastes et complets. Près de 95 % des patients subissant une deuxième laparotomie présentent des adhérences, alors que seulement 1 % se fait réopérer pour une obstruction intestinale due à une adhérence dans l'année qui suit la première laparotomie (Ellis, 1997). Les adhérences sont actuellement la cause la plus courante d'obstruction intestinale (30 à 40 %, voire même 65 à 75 % des obstructions de l'intestin grêle) (Parker *et al.*, 2001). Chez les nouveau-nés, le taux d'adhérences provoquant une obstruction est significativement plus élevé (8 %) (Wilkins et Spitz, 1986).

2.4.3.2. Pathogénie

La formation d'adhérences résulte du processus de cicatrisation du péritoine. Une matrice de fibrine s'installe et sert de pont pour l'organisation des adhérences fibreuses. A cause de l'hypofibrinolyse et de la diminution de l'activité de l'activateur du plasminogène suite à l'intervention, la fibrine n'est pas dissoute. Il y a formation d'adhérences au lieu d'une ré-épithélialisation au niveau de la juxtaposition de surfaces péritonéales lésées (Holmdahl *et al.*, 1997). Divers modèles expérimentaux permettent de reproduire la formation d'adhérences comme par exemple l'abrasion de la séreuse intestinale, la mise en place d'un fil comme du catgut (Moll *et al.*, 1991), l'ischémie intestinale (Parker *et al.*, 1987) et une distension intraluminaire importante (Lundin *et al.*, 1989 ; Dabareiner *et al.*, 1993).

2.4.3.3. Traitement

Une antibiothérapie et l'administration d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens en péri-opératoire sont conseillés afin de réduire la formation d'adhérences (Baxter, 1992). De même, des procédures chirurgicales aseptiques, peu invasives et rapides sont indispensables. L'utilisation de gants sans talc est conseillée (Holmdahl *et al.*, 1997).

En médecine humaine, on conseille l'utilisation d'une solution saline d'acide hyaluronique (Holmdahl *et al.*, 1997) ou des gels d'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA). Ces activateurs du plasminogène augmentent la fibrinolyse et diminuent ainsi la formation d'adhérences (Menzies et Ellis, 1989 ; Vipond *et al.*, 1994). L'efficacité des irrigations péritonéales est contestée. Une étude sur des rats a montré que toutes les solutions de lavage péritonéal utilisées dont du NaCl 0,9 %, de l'isobétadine 1 % et de la chlorhexidine 0,02 % provoquent significativement plus d'adhérences qu'en absence de lavage péritonéal (Van Westreenen *et al.*, 1999).

L'évaluation des traitements préventifs des adhérences est plus difficile chez le cheval que chez l'homme parce que seul un faible pourcentage de cas subit une deuxième laparotomie ou une autopsie après une première laparotomie. Diverses études d'induction expérimentale d'adhérences (sur un nombre restreint de chevaux) ont été réalisées et il apparaît que l'utilisation en chirurgie d'une solution de carboxyméthylcellulose (Moll *et al.*, 1991 ; Hay *et*

al., 2001) ou d'un film résorbable d'hyaluronate et de carboxyméthylcellulose (Mueller *et al.*, 2000) diminue significativement la formation d'adhérences. Toutefois, ces membranes sont de taille réduite et coûteuses, ce qui rend leur utilisation difficile chez le cheval (Schramme et Butson, 1997). De même, une étude clinique a attribué un effet bénéfique à la résection du grand épiploon en chirurgie (Kuebelbeck *et al.*, 1998). Différents traitements post-opératoires testés dans des études expérimentales, comme le lavage péritonéal abondant via une sonde péritonéale par une solution de Ringer lactate (Hague *et al.*, 1998) et l'administration d'héparine à faibles doses par voie générale (Parker *et al.*, 1987) ont montré une diminution significative du nombre d'adhérences.

Néanmoins, il y a actuellement environ 20 % de risque de récurrence de coliques suite à ce problème d'adhérences et l'on n'a pas encore trouvé le moyen de diminuer leur formation de façon significative (Schramme et Butson, 1997).

2.4.4. Infection et déhiscence de plaie de laparotomie

2.4.4.1. Types de complication de plaie abdominale

Les complications associées aux plaies de laparotomie sont l'œdème, la déhiscence accompagnée ou non d'éventration, l'infection avec exsudation, la cellulite, la formation de fistules et la formation de hernies.

2.4.4.2. Facteurs prédisposant

Ces complications sont attribuées à la contamination du site chirurgical lors d'entérotomies ou d'entérectomies, au mauvais choix du matériel de suture et de la technique de suture, à un excès de tissu gras sous-cutané, à une phase de réveil agitée, à de l'exercice physique trop précoce et à une nutrition déficiente (Baxter, 1992). Lors d'interventions pour une obstruction du gros intestin, le taux d'infection de la plaie abdominale semble plus élevé que pour celles de l'intestin grêle sans que l'on puisse mettre en relation cette observation avec une contamination par du contenu intestinal (McCarthy et Hutchins, 1988 ; Philips et Walmsley, 1993). L'utilisation de fils irrésorbables pour la suture de la ligne blanche entraînerait plus de fistules ne guérissant qu'après retrait du matériel de suture. Le fil résorbable polyglactin perd 60 % de sa force en 18 jours (McIlwraith, 1978) alors qu'un fascia incisé ne

gagne que 50 % de sa solidité en 50 jours et 80 % à 100 jours (Kobluk *et al.*, 1989). Ceci illustre l'importance du respect de la restriction de l'activité physique dans les premières semaines après l'intervention. Une étude rétrospective sur 210 cas de coliques chirurgicales a montré une incidence de 16 % de hernies abdominales avec comme facteurs prédisposant l'infection de la plaie abdominale, l'utilisation de catgut chromé pour la fermeture de la ligne blanche, une laparotomie préalable et des coliques en phase post-opératoire (Gibson *et al.*, 1989).

2.4.5. Fourbure

2.4.5.1. Incidence

C'est une complication plus rare (Hunt *et al.*, 1986 ; Philips et Walmsley, 1993) qui ne se présente que dans environ 1 % des cas de coliques chirurgicales. L'incidence semble accrue dans les affections de l'intestin grêle. Un bilan de 71 cas d'affections intestinales grêles parle même d'un taux de 13 % de fourbures mais il ne mentionne pas le taux de mortalité (Belknap et Moore, 1989). C'est une complication grave à cause de la morbidité importante et de la mortalité qu'elle entraîne. Etant donné la complexité de cette pathologie, seul un bref aperçu peut être donné ici.

2.4.5.2. Pathogénie

Malgré de multiples études, la pathogénie reste toujours contestée. Généralement il est admis que la fourbure survient suite à un phénomène inflammatoire ou infectieux systémique ou localisé. Celui-ci provoquerait une vasoconstriction, un shunt artério-veineux ou la formation de micro-thrombi dans la vascularisation du pied qui entraîneraient une ischémie du podophylle. Le phénomène inflammatoire local déclenché par cette ischémie peut mener à un décollement complet du pied de chair et de la boîte cornée. On assiste alors à une rotation et à un enfoncement de la troisième phalange. Ce décollement peut entraîner la chute du sabot. Des études microscopiques ont montré que le décollement de la lame basale et la destruction de l'épithélium basal des lamelles sont à la base du décollement du sabot dans la fourbure (Pass *et al.*, 1998).

Suite à une induction expérimentale de fourbure Adair et collaborateurs (2000) ont observé une diminution du flux sanguin lamellaire parallèlement à l'apparition des signes

cliniques de fourbure. La présence d'une augmentation significative de la concentration d'endothéline-1, un vasoconstricteur puissant sécrété par les cellules endothéliales, au niveau du tissu conjonctif lamellaire renforce l'hypothèse de vasoconstriction. Cette augmentation est encore plus marquée lors de fourbure chronique que lors de fourbure aiguë (Katwa *et al.*, 1999). Une hyperagrégabilité des plaquettes et un nombre accru d'agrégats entre PMN et plaquettes se retrouvent dans les pieds fourbus. Par contre, on n'a pas trouvé d'activation systémique de la coagulation chez les chevaux affectés et des thrombi ne se retrouvent pas dans tous les pieds fourbus (Weiss *et al.*, 1995 et 1997). L'administration d'un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire lors de l'induction de la fourbure empêche les agrégats de PMN et de plaquettes et diminue fortement l'incidence de la pathologie (Weiss *et al.*, 1998). L'expression accrue de l'interleukine-1 β au niveau des cellules péri-vasculaires des lamelles du podophylle montre également qu'un phénomène inflammatoire local initie la fourbure (Fontaine *et al.*, 2001).

Néanmoins certaines études récentes contestent l'hypothèse d'ischémie en montrant que les chevaux qui développent une fourbure présentent d'emblée une augmentation de la température des sabots et que le développement de la fourbure est accompagné d'une augmentation du flux sanguin sous-lamellaire (Pollitt et Davies, 1998). Le rôle des matrices métallo-protéinases (MMP) a été investigué. On observe *in vitro* une augmentation locale de la gélatinase (MMP-2) dans les vaisseaux entourant les lamelles du podophylle et une diapédèse de PMN (« perivascular cuffing ») ainsi qu'*in vivo* une augmentation de la MMP-9 au niveau de la circulation générale (Mungall et Pollitt, 1999). Suite à une surcharge en grains la prolifération bactérienne provoque une résorption d'exotoxines sous forme de protéases bactériennes à partir du tube digestif. Ces protéases sont capables d'activer les MMP présents dans les cellules lamellaires du podophylle (Mungall *et al.*, 2001). Un inhibiteur spécifique des MMP, le batimastat (BB-94), est capable *in vitro* d'inhiber la séparation entre la lame basale et les cellules sous-jacentes. Il pourrait être intéressant dans la prévention clinique (Pollitt *et al.*, 1998). Suite à la dégradation de la lame basale, le collagène de type IV augmente au niveau sérique (Johnson *et al.*, 2000). On observe une perte du collagène de type IV et VII et du laminin de la lame basale (Pollitt et Daradka, 1998).

Une diminution du métabolisme du glucose des cellules lamellaires peut également induire leur séparation de la lame basale. Ceci pourrait expliquer l'induction de la fourbure par des corticostéroïdes à forte dose ou des pathologies comme l'hyperlipidémie ou l'adénome hypophysaire (Pass *et al.*, 1998 ; French *et al.*, 2000).

2.4.5.3. Traitements

Les traitements classiquement conseillés dans la prévention et le traitement de la fourbure sont les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (phénylbutazone, flunixin méglumine), les piègeurs de formes activées de l'oxygène (FAO) comme le DMSO, les traitements anti-thrombotiques (aspirine, héparine) et les vasodilatateurs périphériques comme l'acépromazine (ACP). Le puissant effet de l'ACP dans la prévention et dans le traitement de la fourbure aiguë ou chronique ne peut être expliqué par le seul effet vasodilatateur. L'ACP a un effet inhibiteur de l'activation leucocytaire *in vitro* et *in vivo*. En présence d'ACP, *in vitro*, les PMN ne peuvent plus être activés ni par l'histamine (blocage des récepteurs H1) ni par le phorbol myristate acétate (PMA), qui possède une activité intracellulaire. L'ACP a également une activité de piègeur de FAO. Ces activités pourraient mieux expliquer son effet bénéfique dans le cas des fourbures. Toutefois, étant donné ses effets hypotenseurs, l'ACP ne doit pas être administré aux chevaux présentant des signes de choc systémique (Serteyn *et al.*, 1997 et 1999). Un maintien de l'appui de la fourchette est également conseillé (Baxter, 1992).

B. PHYSIOPATHOLOGIE DES OBSTRUCTIONS INTESTINALES ET DU CHOC

1. MODIFICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES LOCALES DE L'OBSTRUCTION INTESTINALE

1.1. Obstruction intestinale

En amont d'une obstruction intestinale, on observe une distension due à une accumulation de gaz, de liquides et d'aliments. Au niveau de l'intestin grêle en particulier, on observe une accumulation importante de fluides provenant des sécrétions biliaires et pancréatiques (Shields, 1965). La résorption d'eau à partir de l'intestin diminue progressivement avec l'augmentation de la pression intra-luminale. Lorsque celle-ci dépasse 15 cm d'eau, on observe même une sécrétion de liquide vers l'intestin, ce qui entraîne une perte de liquides et d'électrolytes corporels (Swabb *et al.*, 1982a et b). Cette pression intra-luminale provoque également un

écrasement des veinules, une augmentation de la pression hydrostatique des capillaires, une diminution de la vascularisation de la muqueuse et de la séromusculaire intestinale grêle avec formation d'un œdème de la sous-muqueuse. On n'observe toutefois pas de nécrose de la muqueuse intestinale. Dans la séreuse, on observe de l'œdème, des hémorragies, une perte de cellules mésothéliales et une infiltration par des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN). Après la levée de la pression, on observe une aggravation de ces lésions, ce qui indique la présence de phénomènes d'ischémie – reperfusion (Dabareiner *et al.*, 1993). Lors d'obstruction du gros intestin, c'est surtout la distension abdominale qui mène aux perturbations systémiques par la compression des veines de retour et qui conduit au choc hypovolémique (Huskamp et Kopf, 1983 ; Ducharme *et al.*, 1992).

1.2. Obstruction intestinale étranglée

Dans les cas d'obstruction intestinale étranglée, il y a, outre la compression vasculaire transmurale, un arrêt de la vascularisation intestinale, soit veineuse soit artério-veineuse. Dans certains cas, il existe aussi une occlusion vasculaire sans obstruction de la lumière de l'organe (colique thromboemboliques).

1.2.1. Aspect clinique et microscopique des lésions de l'intestin grêle

L'intestin grêle présente le plus souvent une obstruction étranglée avec occlusion artério-veineuse menant à l'infarctus (obstruction ischémique). Macroscopiquement, une coloration bleue est déjà présente une heure après le début de l'ischémie. Cette coloration devient de plus en plus foncée avec le temps. On observe également une absence de motricité et un épaississement de la paroi. Lorsqu'on lève l'occlusion la couleur et la motricité s'améliorent dans un premier temps pour rechuter quelques heures plus tard, ce qui laisse soupçonner des lésions d'ischémie – reperfusion. Au microscope, on observe au stade débutant un soulèvement de l'épithélium des villosités. Par la suite, on note une perte totale de la structure des villosités et une atteinte des cellules des cryptes régénératrices (White *et al.*, 1980).

Afin de mieux décrire les lésions observées, divers auteurs ont proposé une classification des altérations histologiques de 0 (pas de lésion) à 5 (perte des villosités et nécrose des cellules des cryptes) (Chiu *et al.*, 1970 ; Achren *et al.*, 1973 ; Haglund *et al.*, 1975 ; White *et al.*, 1980) (Tab. II).

Tableau II Nature des lésions histo-pathologiques de l'intestin grêle pour chaque degré de gravité.

Grade	Lésions observées
0	pas de lésion
1	légère séparation entre les cellules épithéliales normales et la lame basale au niveau des pointes des villosités (formation d'un espace de Gruenhagen)
2	perte complète des cellules épithéliales de la pointe des villosités et légère hémorragie au niveau de la lame basale
3	augmentation de l'espace sous-épithélial et hémorragie au niveau de la lame basale et de la sous-muqueuse
4	séparation complète entre l'épithélium et la lame basale jusqu'au niveau de la base des villosités, hémorragie au niveau de la lame basale, hémorragie et œdème au niveau de la sous-muqueuse
5	perte complète de structure des villosités et nécrose débutante des cellules des cryptes

1.2.2. Aspect clinique et microscopique des lésions du gros intestin

En cas d'occlusion veineuse seule la paroi du gros intestin présente un œdème sévère associé à une congestion et à de l'hémorragie. Lorsqu'il s'agit d'occlusion artério-veineuse, on observe une séreuse bleu-gris et pâle, mais peu d'œdème et de congestion. Par contre, les modifications cellulaires sont plus précoces dans ce dernier cas. L'hémorragie et l'œdème de la lame basale et de la sous-muqueuse paraissent plus sévères dans les cas d'obstruction trans-murale, ce qui montre que la circulation collatérale de la paroi n'est plus capable de drainer du liquide ou du sang séquestrés. Les lésions augmentent encore pendant au moins deux heures après la restauration du flux sanguin ce qui suggère également des lésions de reperfusion (Meschter *et al.*, 1991). On observe une destruction irréversible de la muqueuse du colon après quatre heures d'obstruction étranglée veineuse ou artério-veineuse ou après trois heures d'ischémie suivies de deux heures de reperfusion (Snyder *et al.*, 1988 ; Meschter *et al.*, 1991). L'intensité des lésions au niveau de la circulation micro-vasculaire intra-murale semble déterminante dans la survie de l'intestin même si un pouls est palpé au niveau des grands vaisseaux mésentériques et si la coloration de la séreuse est peu modifiée (Snyder *et al.*, 1988).

Une étude de l'ultrastructure des cellules de la paroi du côlon, en particulier en cas d'obstruction veineuse seule, montre de l'œdème interstitiel et intracellulaire. On observe une dégénérescence cellulaire précoce marquée par une distension des organites intra-cellulaires comme le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Snyder *et al.*, 1992). Une perte de plus de 97 % de l'épithélium de surface et de plus de 50 % de l'épithélium des cryptes serait associée à une mortalité de 100 % dans les cas cliniques de volvulus du gros intestin (Snyder *et al.*, 1989). Une gradation de 0 (normal) à 4 (lésion sévère modifiant toute la structure de la muqueuse intestinale) est proposée (Meschter *et al.*, 1991), mais étant donné la différence de l'importance de l'œdème de la paroi du côlon selon les cas, la classification est moins aisée. D'autres auteurs proposent d'évaluer non seulement la muqueuse mais également la sous-muqueuse et les cryptes (Snyder *et al.*, 1988).

2. LÉSIONS D'ISCHEMIE – REPERFUSION

De nombreuses observations cliniques révèlent que les lésions intestinales s'aggravent après la phase d'ischémie lors de la reperfusion de l'organe et conduisent à la nécrose cellulaire. Ce phénomène a été observé par Ames et collaborateurs (1968) au niveau du cerveau puis par d'autres auteurs au niveau d'autres organes comme le foie, le cœur, les reins, les muscles (Parks *et al.*, 1982 ; McCord, 1987 ; Serteyn *et al.*, 1994). Au niveau intestinal, diverses études expérimentales démontrent l'existence des lésions d'ischémie – reperfusion ainsi que l'implication des formes activées de l'oxygène et de l'azote générées d'une part au niveau cytosolique et mitochondrial et, d'autre part, au niveau des PMN activés au sein des tissus. (Bounous, 1982 ; Parks *et al.*, 1982 ; Parks et Granger, 1986 ; McCord, 1987). Une des lésions les plus précoces est l'augmentation de la perméabilité capillaire de la muqueuse intestinale entraînant l'œdème et une sécrétion accrue vers la lumière intestinale (Cook *et al.*, 1971 ; Haglund et Lundgren, 1972). Toutefois, lors d'obstruction artério-veineuse complète, les lésions d'ischémie ne sont pas accentuées durant la reperfusion. Ceci peut être dû au fait que les lésions d'ischémie sont trop sévères que pour encore être aggravées par les phénomènes de reperfusion (Park *et al.*, 1990).

3. FORMES ACTIVEES DE L'OXYGENE ET DE L'AZOTE (RNOS)

Avant d'aborder le phénomène d'ischémie – reperfusion sous l'aspect biochimique et étant donné que les formes activées de l'oxygène sont impliquées dans des processus physiologiques et pathologiques à plusieurs niveaux, il nous a semblé utile de présenter un résumé des éléments indispensables à la compréhension de nos recherches.

3.1. Caractéristiques des réactions formant les RNOS

La réactivité de l'oxygène et ses possibilités de produire des dérivés oxydants ont été méconnues jusqu'aux années 1960. L'oxygène était considéré comme un élément nécessaire à la vie aérobie, mais comme simple « substrat » destiné à recevoir 4 électrons en provenance de la chaîne respiratoire mitochondriale et à être réduit en eau. Depuis quelques dizaines d'années, la façon de considérer l'oxygène s'est transformée. On admet qu'il existe un métabolisme de l'oxygène gouverné par des enzymes spécialisées, avec des possibilités d'erreurs de métabolisation conduisant à la formation excessive d'espèces dérivées dangereuses, les ROS ("reactive oxygen species"), désignées aussi sous d'autres sigles comme ROI, ("reactive oxygen intermediates") ou FAO (« formes activées de l'oxygène »). Les études sur les ROS se sont multipliées après les travaux de Fridovich (McCord et Fridovich, 1968 ; Fridovich, 1978) sur l'anion superoxyde et se sont compliquées par l'arrivée de la famille des « reactive nitrogen species » (RNS) avec pour premier maillon le monoxyde d'azote (NO[•]). En réalité, les RNS sont un sous-groupe des ROS, puisque leur formation à partir du NO[•] dépend de la présence de l'oxygène et qu'elles contiennent toutes un ou plusieurs atomes d'oxygène. Le terme RNOS (« reactive nitrogen oxygen species ») désigne l'ensemble des espèces activées dérivées de l'oxygène, avec ou sans atome d'azote.

3.1.1. Equilibre oxydo-réducteur ou état « rédox » de la cellule

Chaque espèce chimique possède une tendance à accepter (composé oxydant) ou à donner (composé réducteur) des électrons, caractérisée par la valeur de son potentiel électrochimique normal, E_0 , exprimé en volts (V). Toutes les espèces chimiques sont classées sur une échelle des valeurs de E_0 par rapport à un composé de référence, l'hydrogène dont $E_0 = 0$ V. Les composés les plus oxydants ont les valeurs de E_0 positives les plus élevées, comme par exemple E_0 pour $O_2 = + 1,229$ V ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$) (Sawyer, 1991). L'oxydo-réduction met

toujours en jeu un couple oxydant-réducteur dans lequel l'oxydant sera l'espèce qui possède la valeur d' E_0 la plus élevée. Certaines espèces chimiques dont l' E_0 n'est pas situé aux extrémités de l'échelle des potentiels électrochimiques pourront agir comme oxydant ou comme réducteur selon la valeur d' E_0 de l'espèce partenaire.

Tout milieu biologique est caractérisé par un équilibre entre espèces oxydantes et réductrices (l'état « rédox »), difficile à mesurer *in vivo*. Dans les conditions physiologiques normales, il semble y avoir un environnement intracellulaire réducteur (études faites surtout pour le cytosol des leucocytes), dû à la présence de molécules porteuses de fonctions thiols et d'un excès de petites molécules réductrices (Kamata et Hirata, 1999).

3.2. Cascade des formes activées de l'oxygène et de l'azote (RNOS)

L'oxygène fondamental (O_2) est un biradical (2 électrons célibataires) qui, en fonction des règles quantiques strictes, ne peut pas réagir avec les molécules non radicalaires (la majorité des molécules du vivant). *In vivo*, cette barrière réactionnelle est franchie par voie enzymatique.

3.2.1. Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

In vivo, la première étape dans la formation des RNOS est la réduction monoélectronique d' O_2 pour le transformer en monoradical, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cette étape est réalisée par des enzymes spécialisées, les oxydases (comme la NADPH-oxydase ou la xanthine oxydase) qui apportent un électron et transforment l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$ (Babior, 1999). L' $O_2^{\cdot-}$ n'est pas un oxydant, mais plutôt un réducteur (comme le confirme la valeur de son $E_0 = -0,33$ V) (Sawyer, 1991). Il peut diffuser dans les milieux hydrophobes (membranes cellulaires) où il agit en désestérifiant les phospholipides (Deby et Goutier, 1990). En milieu aqueux, sa durée de vie est limitée à quelques millisecondes et il est le point de départ d'une cascade de RNOS. En effet, à partir d' $O_2^{\cdot-}$, on aboutit spontanément ou par voie enzymatique (action de la superoxyde dismutase : SOD) au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) d'une part et, d'autre part, au peroxynitrite ($ONOO^-$) par réaction avec le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) produit par la NOSynthase à partir de l'arginine (Pryor et Squadrito, 1995).

3.2.2. Monoxyde d'azote (NO[•]) et peroxy-nitrite (ONOO⁻)

Le NO[•] est produit par la NOSynthase constitutive à un taux basal faible et joue un rôle régulateur normal (vasodilatation, régulation d'enzymes par nitrosation/dénitrosation), mais il peut être produit en quantité plus importante par la NOSynthase inductible (dans les situations inflammatoires notamment) (Beckman et Koppenol, 1996 ; Grisham *et al.*, 1999 ; Van der Vliet et Cross, 2000). Sa diffusion intra- et extracellulaire semble libre, mais limitée par sa faible durée de vie (quelques secondes). Le NO[•] est un oxydant faible qui n'a pas de capacité de nitration, mais qui est un excellent nitrosant des hèmes et des fonctions thiols (-SH) avec formation réversible de nitrosothiols (-S-NO) (Beckman, 1996). Il réagit rapidement avec l'anion superoxyde (voir ci-dessous) et avec l'oxygène. Avec l'oxygène, il forme NO₂[•] (agent nitrant), puis N₂O₃ (provenant de NO + NO₂) non radicalaire, mais réagissant rapidement avec H₂O pour former des nitrites et ensuite des nitrates (le dosage des nitrites et des nitrates est souvent pris comme le témoin de la formation de NO[•]) (Beckman, 1996).

Mais, la voie d'action la plus « dangereuse » du NO[•] est celle de sa réaction avec O₂^{•-} pour former le peroxy-nitrite (ONOO⁻) selon une vitesse de réaction limitée uniquement par la vitesse de diffusion des deux partenaires, plus rapide que celle de la réaction de la SOD avec O₂^{•-}. Sa formation *in vivo* a été suggérée dès 1990 dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales et au sein des mitochondries (Carreras *et al.*, 1994 ; Beckman, 1996 ; Thom *et al.*, 1997 ; Ghafourifar et Richter, 1997). Il diffuse passivement et via les canaux ioniques, mais sa durée de vie est extrêmement courte (< 1 seconde) au pH physiologique (où il est en équilibre avec ONOOH). Il se transforme en nitrates/nitrites ou se décompose en espèces radicalaires ([•]OH et NO₂[•]) responsables de nitrations et d'hydroxylations (Beckman *et al.*, 1990 et 1994 ; Kissner *et al.*, 1997). C'est un oxydant puissant (E₀ = 1,4 V) qui réalise des oxydations à un ou 2 électrons (Kissner *et al.*, 1997). Il attaque les fonctions thiols (-SH) et -S-CH₃, les lipides, les bases nucléaires, les protéines (fonctions amines) et de nombreuses autres molécules (Beckman *et al.*, 1994 ; Quijano *et al.*, 1997). Il attaque les centres à métaux de transition (enzymes hémiques, SOD, hémoglobine) et semble un agent nitrant particulièrement actif sur les cycles aromatiques (tyrosine, tryptophane) et donc sur les enzymes contenant des résidus tyrosyles au site actif (Ischiropoulos, 1998). Il réagit avec le CO₂ pour former un nitrosoperoxy-carboxylate (ONOOCO₂⁻) qui évolue vers la production de [•]NO₂ et CO₃^{•-} (ou de NO₃⁻ et CO₂) responsable d'une augmentation des nitrations (Radi *et al.*, 2001). L'ONOO⁻ et les nitrites (dérivés aussi du NO[•]) peuvent être utilisés par la myéloperoxydase (MPO) des neutrophiles pour produire des

dérivés instables, capables de nitrer ou de chloriner les biomolécules (Sampson *et al.*, 1998 ; Deby-Dupont *et al.*, 1999 ; van der Vliet *et al.*, 2000).

3.2.3. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est obtenu à partir d'O₂^{•-} soit par dismutation spontanée soit par dismutation catalysée par la SOD. Cette nouvelle espèce n'est pas radicalaire et possède une durée de vie pouvant atteindre plusieurs minutes. Le H₂O₂ diffuse à partir de son lieu de production, mais il est détruit par les peroxydases, ce qui limite son action. De plus, son potentiel oxydo-réducteur (E₀ = + 0,66 V) est moyen comparé à celui de ONOO⁻. Il joue un rôle important dans l'activité oxydante des leucocytes polymorphonucléaires parce qu'il est utilisé par la myéloperoxydase (MPO) des neutrophiles (et par l'éosinophile peroxydase) pour former l'acide hypochloreux (HOCl) (Babior, 2000). Il pourrait réagir avec les nitrites et avec ONOO⁻ pour donner des espèces nitrantes, mais cette voie reste hypothétique.

Par contre, sa réaction avec HOCl (réaction de Mallet) fournit l'oxygène singulet (¹O₂), une forme de O₂ non radicalaire, obtenue par appariement des deux électrons célibataires (improprement qualifiés souvent de « libres ») d'O₂, appariement qui nécessite un apport d'énergie considérable et explique que ¹O₂ est très énergétique et donc très réactionnel: il peut attaquer tous les types de molécules organiques. La présence d'oxygène singulet aurait été démontrée au cours de l'activation des phagocytes et attribuée à la réaction entre H₂O₂ et HOCl (Ryter et Tyrrell, 1998). On attribue également sa formation à la transformation d'ONOO⁻ (Khan, 1995 ; DiMascio *et al.*, 1996).

3.2.4. Radical hydroxyle (•OH)

Le H₂O₂ est aussi à l'origine du radical hydroxyle (•OH) s'il y a, dans le milieu, des ions métalliques (comme le fer Fe²⁺ complexé par un ligand activateur): cette réaction est connue sous le nom de « réaction de Fenton » et semble peu probable *in vivo* (Beckman *et al.*, 1990 ; Kissner *et al.*, 1997). Le •OH pourrait aussi se former lors de la décomposition du peroxydinitrite. Le •OH est un agent d'oxydation (hydroxylation des cycles aromatiques), mais son action est limitée par sa très courte durée de vie (Deby-Dupont *et al.*, 1995a).

3.2.5. Acide hypochloreux (HOCl)

Il est caractéristique des neutrophiles (et des éosinophiles) puisqu'il est synthétisé par la myéloperoxydase (MPO) ou par l'éosinophile peroxydase (EPO) à partir de H_2O_2 et de Cl^- (Deby-Dupont *et al.*, 1999). C'est un oxydant puissant dont la durée de vie pourrait être suffisante pour permettre sa diffusion à distance, mais il n'existe aucune donnée précise sur sa durée de vie et sa diffusibilité. Il est capable d'oxyder les structures -SH et d'attaquer les fonctions amines pour donner des aldéhydes toxiques et des chloramines dont la toxicité reste discutée (Winterbourn et Brennan, 1997). Il semble capable de réagir (seul ou via la MPO) avec les nitrites et le peroxyde d'azote pour produire des espèces nitrantes et chlorinantes via des intermédiaires instables comme NOCl et NO_2Cl (Eiserich *et al.*, 1998). La figure 2 (p. 52) illustre les différentes formes activées de l'oxygène et de l'azote et leurs interactions.

Fig. 2

Schéma de la cascade des principales espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS: « reactive nitrogen oxygen species ») *in vivo*.

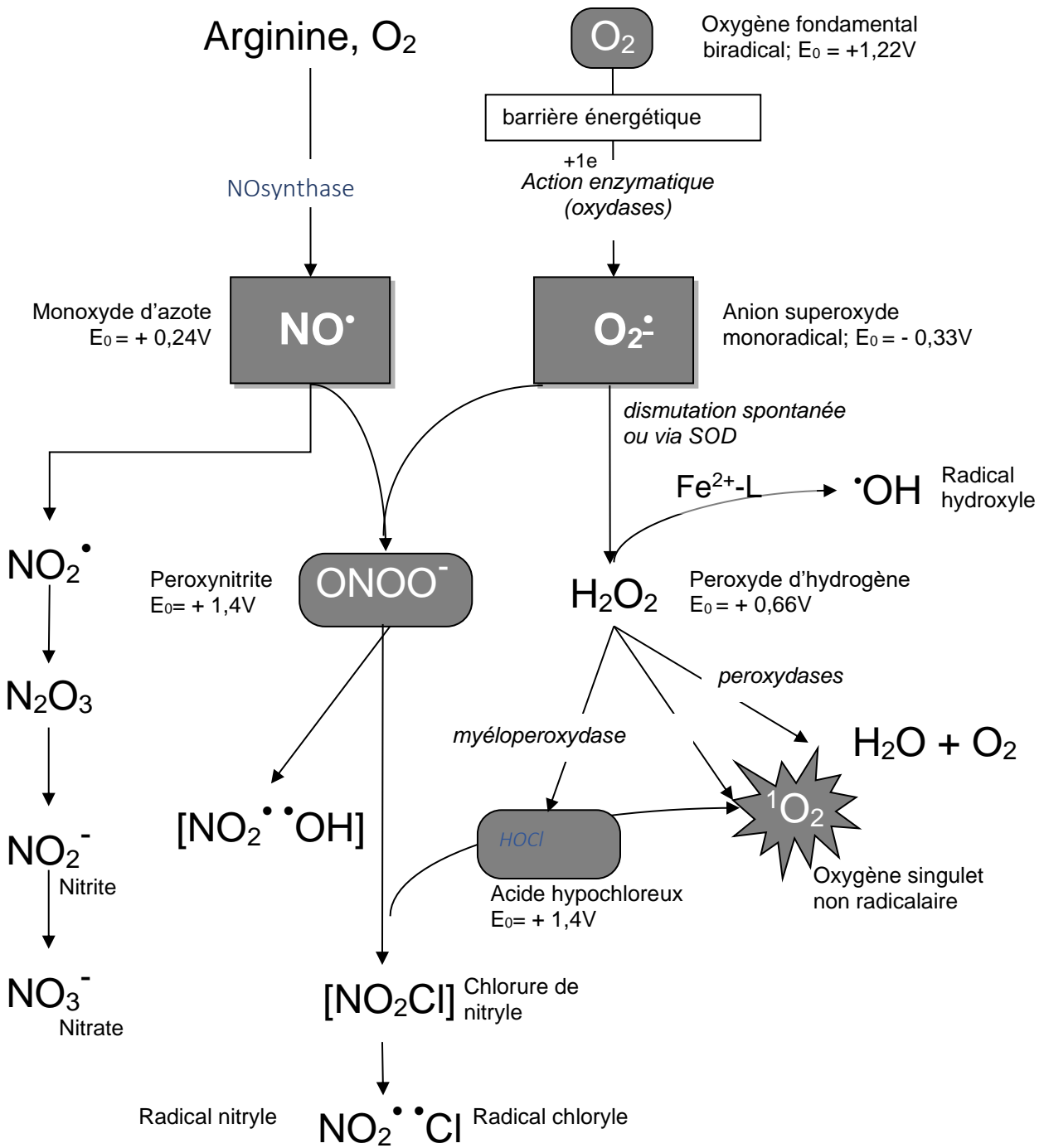
A partir de l'oxygène fondamental (O_2), inactif vis-à-vis de la matière vivante (interdiction quantique de réaction), deux enzymes permettent la formation des deux espèces activées « points d'entrée » de la cascade, l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote, dont dérivent les autres RNOS.

Les [] entourent les intermédiaires réactionnels particulièrement instables.

Le fer (et les métaux de transition en général) doit être complexé par un ligand activateur (L) pour intervenir dans la cascade.

Fig. 2

La famille des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote



3.3. Agressions oxydantes

Dans les conditions physiologiques, les RNOS jouent un rôle majeur dans la transduction du signal cellulaire et lors de la défense antibactérienne (Klebanoff, 1999 ; Saran *et al.*, 1999). L'équilibre oxydo-réducteur de la cellule est maintenu grâce aux mécanismes de défenses. Ceux-ci sont des molécules antioxydantes (glutathion, vitamine E), des enzymes spécialisées (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) et des protéines qui « neutralisent » le Fe^{2+} circulant (céruleoplasmine, transferrine, haptoglobine). Les enzymes agissent par voie catalytique de sorte qu'une molécule d'enzyme est capable de neutraliser quelques centaines, voire quelques milliers, de molécules toxiques. Les antioxydants agissent de manière stoechiométrique. Une molécule d'antioxydant est capable de neutraliser une ou plusieurs espèces dangereuses. Leur efficacité est limitée par l'importance et le lieu de production des espèces toxiques : la vitamine E est active en milieu lipophile, tandis que le glutathion réduit (GSH) est efficace en milieu hydrophile. Après réaction, la vitamine E, devenue radicalaire, peut être régénérée par la vitamine C et le glutathion oxydé, dimérisé en GSSG, est régénéré par la glutathion réductase (Deby-Dupont *et al.*, 1995b).

Dans des conditions pathologiques, comme lors de réaction inflammatoire excessive et systémique ou lors de phénomène d'ischémie-reperfusion, les mécanismes de défense peuvent être dépassés et on assiste à une réelle agression oxydante (Yao *et al.*, 1998). Les RNOS produits en excès agissent de manière non spécifique de sorte que les cibles atteintes sont variées et toutes les molécules peuvent être atteintes : protéines, lipides, hydrates de carbone, acides nucléiques. Il y a cependant des cibles plus sensibles : les lipides insaturés, certains acides aminés et composés aromatiques, les fonctions -SH. En outre, l'oxygène entretient les réactions radicalaires. Lorsqu'une molécule passe à l'état radicalaire, la disparition des radicaux se fera par leur recombinaison avec arrêt de la réaction. La présence ubiquitaire d' O_2 empêche cette recombinaison. Le radical formé réagit avec O_2 pour produire de nouveaux radicaux et déclencher une réaction en chaîne comme lors de la lipoperoxydation des membranes (Deby-Dupont *et al.*, 1995a) (figure 3).

Fig. 3

Principaux effets *in vivo* des RNOS

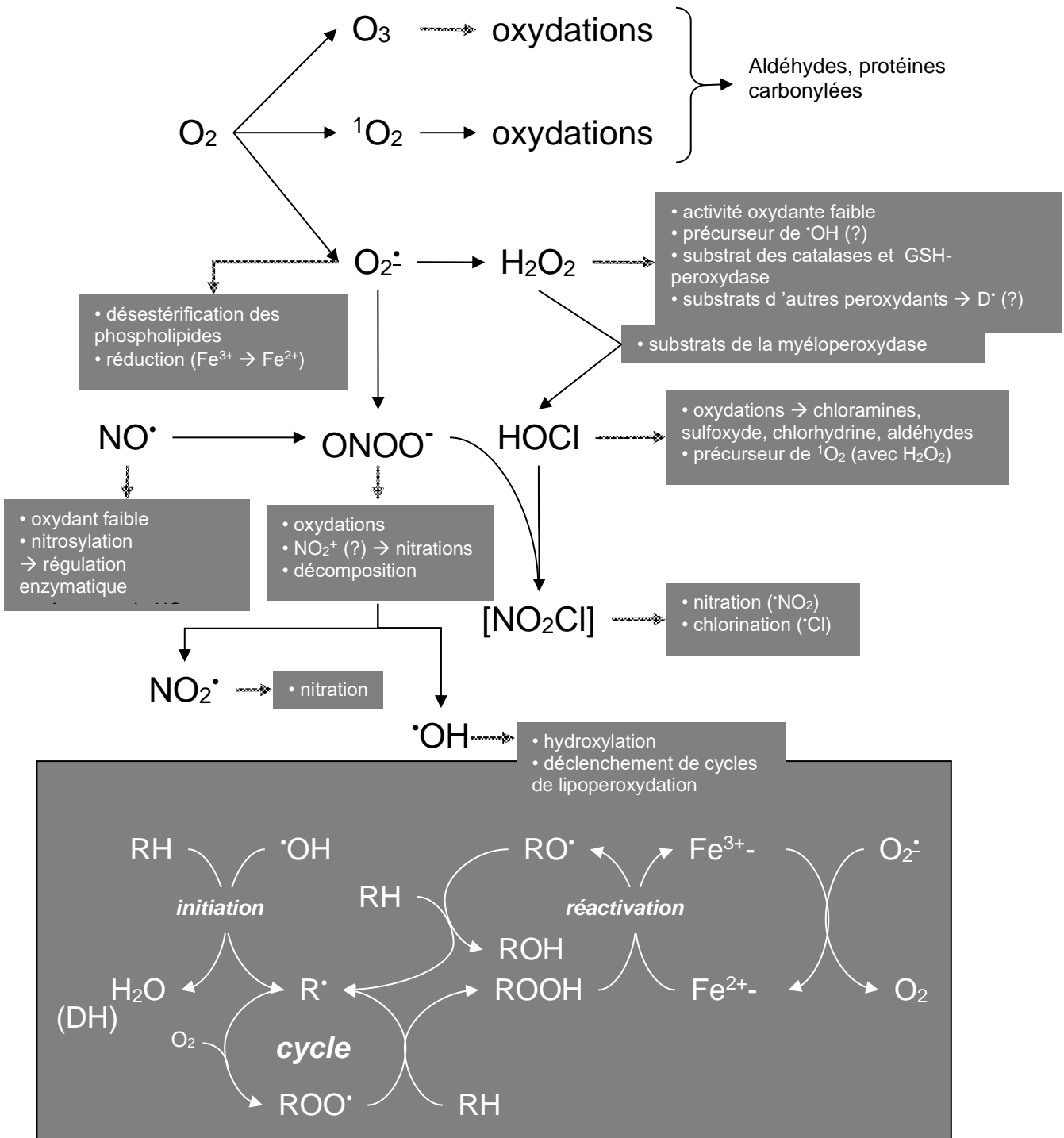


Fig. 3

Résumé des principaux effets exercés *in vivo* par les espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS).

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et l'ozone (O_3) attaquent en formant surtout des fonctions aldéhydes (sur les lipides insaturés) et carbonyles (sur les protéines, acides aminés, peptides).

Le ? indique que la formation du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (réaction de Fenton) reste hypothétique *in vivo*.

$\text{D}\cdot$: indique que l'utilisation d' H_2O_2 par certaines peroxydases (de nature hémique: PGHsynthétase, myéloperoxydase, hémoglobine libre) conduit souvent à produire des radicaux secondaires ($\text{D}\cdot$) à partir d'un substrat donneur d'électrons (DH).

NO_2^+ : ion nitronium; sa formation nécessite des conditions acides et reste hypothétique *in vivo* (formation possible dans le phagolysosome des neutrophiles ?).

Le cycle de lipoperoxydation est déclenché par $\cdot\text{OH}$ ou par d'autres radicaux formés en milieu lipidique (comme $\text{D}\cdot$ formé à partir de DH). RH représente une molécule lipidique insaturée (acide gras par exemple) et $\text{R}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, ROOH et ROH sont respectivement les radicaux alkyle, alkoyle et peroxyde, l'hydroperoxyde et l'alcool, dérivés de RH. L: ligand activateur du fer; le complexe $\text{Fe}^{2+}\text{-L}$ permet de réactiver le cycle et l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) entretient la réactivation en réduisant le Fe^{3+} .

En l'absence d'oxygène (O_2), la dimérisation entre radicaux $\text{R}\cdot$ (peu mobiles et de courte durée de vie) arrête le cycle.

3.4. Rôle de la myéloperoxydase

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la myélorperoxydase humaine (MPO), mais la MPO équine n'a jamais été purifiée. Le mode d'action et les caractéristiques suivants sont donc ceux de la MPO humaine. Chez l'homme, on observe une activation des PMN dans des phénomènes inflammatoires ou infectieux intenses. La dégranulation massive et la mort des PMN relâchent la MPO et d'autres enzymes hydrolytiques. La MPO possède une activité antimicrobienne par la production de RNOS.

3.4.1. Caractéristiques de la MPO humaine

La MPO est une peroxydase hémique présente en quantités importantes dans les granules primaires des PMN (Tobler et Koeffler, 1991 ; Borregaard et Cowland, 1997 ; Klebanoff, 1999). Les monocytes en contiennent une faible quantité mais ils perdent la MPO lors de leur maturation en macrophages. L'enzyme mature est un homodimère glycosylé de 150 kDa avec un groupe prosthétique hémique à Fe³⁺. Il est lié à un résidu aspartate, à un résidu glutamate et à un résidu méthionine par une liaison sulfonium qui est caractéristique de la MPO et responsable des propriétés de chlorination (Fenna *et al.*, 1995 ; Kooter *et al.*, 1999). L'enzyme est composée de deux hémi-enzymes à deux sous-unités (une légère de 13,5 kDa et une lourde de 59 kDa reliées par un pont disulfure) (Nauseef *et al.*, 2000).

La MPO catalyse l'oxydation à deux électrons des ions halogènes, en particulier le chlore, pour former l'acide hypochloreux (HOCl) (Taurog et Dorris, 1992). L'enzyme naturelle mature à Fe³⁺ réagit avec H₂O₂ pour former le « compound I » (Cd I) très réactionnel avec une structure Fe (IV) et un radical centré sur un acide aminé. Pour retourner à la forme Fe³⁺, le Cd I réagit rapidement avec les ions chlorures (Cl⁻) pour former de l'acide hypochloreux et le MPO-Fe(III) (tableau III). A partir du Cd I le « compound II » à Fe(IV) sans radical peut se former par réduction. Le Cd II réagit avec un nouveau réducteur DH en formant un radical (D[•]). Ce réducteur peut être la tyrosine qui est alors oxydée en radical tyrosyle à l'origine de lipoperoxydations. Un des réducteurs pouvant bloquer la MPO de façon réversible est l'anion superoxyde qui peut réduire le Fe(III) en Fe(II) et former le « compound III » (Cd III) inactif. Ceci peut se produire en milieu à pH alcalin ou neutre dans un phagolysosome (Kettle *et al.*, 1993 ; King *et al.*, 1997) (Tab. III).

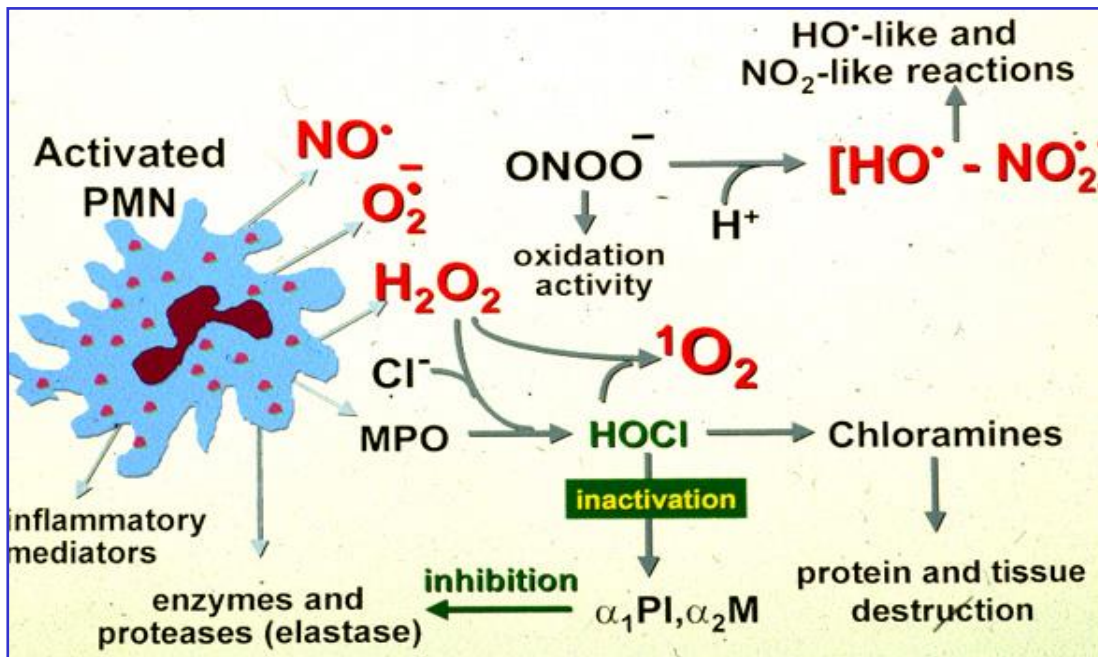
Tableau III Ensemble des réactions contrôlées par la MPO

Activité de chlorination	MPO-Fe (III) + H ₂ O ₂ → Cd I + H ₂ O
	Cd I + Cl ⁻ + H ⁺ → MPO-Fe(III) + HOCl
Activité de peroxydase	MPO-Fe (III) + H ₂ O ₂ → Cd I + H ₂ O
	Cd I + DH → Cd II + D [•] + H ⁺
	Cd II + DH → MPO-Fe (III) + D [•] + H ⁺
Formation du Cd III	MPO-Fe (III) + DH → MPO-Fe (II) + D [•] + H ⁺
	MPO-Fe (II) + O ₂ → MPO-Fe (II)-O ₂ (Cd III)

3.4.2. Espèces oxydantes produites par la MPO

L'acide hypochloreux est un oxydant capable de chloriner de nombreuses biomolécules (Klebanoff, 1999). Il réagit avec le H_2O_2 , les nitrites voire même le peroxy-nitrite pour donner des espèces nitrantes (Radi *et al.*, 2001) ainsi qu'éventuellement avec l'anion superoxyde pour former le radical hydroxyle. Via la réaction de HOCl avec les nitrites ou le peroxy-nitrite, la MPO est à l'origine de nitration et de chlorination d'acides aminés comme la tyrosine. La réaction entre le HOCl et le H_2O_2 forme de l'oxygène singulet (Karnofsky *et al.*, 1984), mais cette réaction reste discutée *in vivo* (Fig. 4). Ces productions d'espèces oxydantes sont à la base de la défense de l'organisme et expliquent la chimioluminescence observée lors de l'activation leucocytaire (Benbarek *et al.*, 1996).

Fig. 4 Les RNOS produits par le PMN activé et leurs effets.



3.4.2.1. *Activité antimicrobienne de la MPO*

La MPO peut se fixer sur des récepteurs de la membrane bactérienne et peut, par la production des espèces oxydantes citées ci-dessus, attaquer des structures comme les lipides insaturés, les groupes Fe-S ou SH, les acides aminés, les bases nucléiques et les hèmes (Saran *et al.*, 1999). Ceci va altérer la perméabilité membranaire et le fonctionnement enzymatique ainsi que la chaîne respiratoire entraînant la mort bactérienne. La fixation aux membranes permet une attaque extracellulaire de microorganismes trop volumineux que pour être phagocytés.

3.4.2.2. *Effets cytotoxiques de la MPO*

Lors d'une réaction inflammatoire incontrôlée, la MPO est libérée et, mise en contact avec d'autres cellules, elle risque de provoquer une destruction cellulaire locale. Dans le plasma, la MPO est liée et inactivée de façon réversible par l'albumine. La présence de concentrations anormalement élevées de MPO dans le plasma et dans d'autres liquides biologiques comme la lymphe, le liquide péritonéal, pleural ou de lavage bronchoalvéolaire est le signe d'une activation excessive des PMN (Pincemail *et al.*, 1991 ; Winterbourn *et al.*, 2000 ; Mathy-Hartert *et al.*, 2000).

La MPO est cytotoxique pour les érythrocytes (Klebanoff et Clark, 1975 ; Tobler et Koeffler, 1991), elle active les plaquettes et peut oxyder les PMN eux-mêmes. Elle est particulièrement toxique pour les cellules endothéliales et les fibroblastes qui peuvent la fixer et l'internaliser (Zabucchi *et al.*, 1989 ; Mathy-Hartert *et al.*, 1995). La MPO reste active à l'intérieur des cellules endothéliales et utilise le H₂O₂ formé par l'activité des NADPH-oxydases endogènes (Griendling *et al.*, 2000) et d'autres substances pour la production d'espèces oxydantes (Weiss, 1989). L'acide hypochloreux qu'elle produit oxyde les acides aminés en aldéhydes qui deviennent des composés actifs au niveau du site inflammatoire (Hazen *et al.*, 1998). Il peut également détruire l'action des antiprotéases, comme l' α_1 -protéinase inhibiteur et l' α_2 -macroglobuline, permettant l'activité de l'élastase et d'autres protéases leucocytaires (Cochrane *et al.*, 1983 ; Suter *et al.*, 1992) (Fig. 3). Le glutathion (GSH) et les fonctions -SH sont oxydés de manière irréversible par l'acide hypochloreux ce qui perturbe l'équilibre oxydo-réducteur (Winterbourn et Brennan, 1997). La MPO peut également activer des proenzymes comme la progélatinase ou la procollagénase, ou inactiver leurs inhibiteurs (antiprotéases), ce qui conduit à la destruction du tissu conjonctif.

3.4.2.3. Effets modulateurs de la MPO sur les fonctions cellulaires

Les RNOS jouent un rôle dans la transduction du signal intracellulaire dans les conditions normales comme dans les conditions pathologiques (p. ex. pour l'activation des protéines kinases). L'acide hypochloreux produit par l'action de la MPO est un activateur du facteur de transcription nucléaire, le NF- κ B qui régule l'expression des médiateurs inflammatoires (Schoonbroodt *et al.*, 1997). La MPO a également une influence sur les monocytes et perturbe le fonctionnement des lymphocytes B, T et NK (El-Hag et Clark, 1987). Ces interactions avec les lymphocytes sont encore peu comprises. Lorsque la MPO est internalisée par les macrophages elle augmente leur pouvoir destructeur de microorganismes et augmente de manière dose dépendante la production de certaines cytokines (Lefkowitz *et al.*, 1992 ; Mathy-Hartert *et al.*, 1996 ; Schwartz *et al.*, 1996).

4. ASPECT BIOCHIMIQUE DE L'ISCHEMIE – REPERFUSION

4.1. Approche globale du phénomène

Les effets d'une chute ou d'une perte d'arrivée d'oxygène ne sont pas les mêmes d'un organe à l'autre; la sensibilité cérébrale à l'hypoperfusion est bien connue, mais des organes comme le foie et le pancréas y sont également très sensibles, même s'ils sont cliniquement plus "silencieux". D'une manière générale, les premières cellules atteintes sont les cellules à haut métabolisme qui utilisent d'importantes quantités d'ATP qui leur sont fournies par la respiration aérobie. L'intégrité de la fonction mitochondriale leur est indispensable. Les effets d'une ischémie de courte durée sont généralement réversibles, même si elle entraîne des altérations qui peuvent conduire à la nécrose d'un certain nombre de cellules. Au delà d'un certain temps d'ischémie, variable selon l'organe, il y a nécrose cellulaire massive et destructions irréversibles. Dans l'anoxie-réoxygénation, le taux d'ATP (et donc la mitochondrie) jouerait un rôle majeur, bien qu'encore mal compris, dans l'orientation de la cellule vers l'apoptose ou la nécrose (Lelli *et al.*, 1998). La mort cellulaire par nécrose est un dysfonctionnement cellulaire aigu qui apparaît suite à des conditions sévères (toxiques, anoxie) entraînant une diminution rapide du taux d'ATP. Morphologiquement on observe une augmentation du volume cellulaire avec rupture de la membrane, ce qui provoque une réaction inflammatoire. La mort cellulaire par apoptose, par contre, survient dans des situations physiologiques de remplacement cellulaire mais aussi pathologiques. Elle n'entraîne pas de réaction inflammatoire. La cellule se rétrécit, la

chromatine se condense, l'ADN se fragmente et des corps apoptotiques se forment dans le cytoplasme. Diverses protéases, surtout les caspases, interviennent dans ce phénomène (Chandra *et al.*, 2000).

Selon l'importance de la chute en ATP, il y a mort cellulaire par apoptose ou nécrose. La mitochondrie est donc un élément clef: elle intervient dans le déclenchement de l'apoptose par une voie qui fait intervenir la libération du cytochrome C et les caspases 9 et 3 (Bernardi *et al.*, 2001). Après la phase d'anoxie, le rétablissement de la perfusion accentue les dégâts parce que les cellules altérées vont utiliser l'oxygène de manière inadéquate. Elles vont produire des formes oxygénées activées toxiques, capables d'accentuer les dégâts cellulaires par la peroxydation et la dégradation des lipoprotéines membranaires ainsi que par action sur de nombreuses enzymes et sur les mécanismes de la transduction du signal. Les altérations locales provoquées par l'ischémie entraînent une réaction inflammatoire responsable de l'appel des leucocytes et de leur activation, phénomène qui s'accroît à la reperfusion. Le résultat final de ces phénomènes consiste en une modification de la perméabilité membranaire des capillaires, avec une libération de nouveaux médiateurs et, dans les cas les plus graves, à une extension de la réaction inflammatoire pouvant conduire à une réaction généralisée et à la défaillance multisystémique (Ar'Rajab *et al.*, 1996).

4.2. Mécanismes cellulaires de l'ischémie – reperfusion

Les conséquences cellulaires de l'ischémie – reperfusion (anoxie-réoxygénation) sont nombreuses (Saris et Eriksson, 1995) :

- une chute du pool des nucléotides adénylés (ATP, ADP et AMP),
- une augmentation du phosphate et du Ca^{2+} cytosoliques,
- une altération de la perméabilité membranaire,
- une augmentation de la production des RNOS, essentiellement au moment de la réoxygénation,
- des altérations de la chaîne mitochondriale,
- des altérations des systèmes enzymatiques.

4.2.1. Pool des nucléotides adénylés

En conditions normales de respiration cellulaire aérobie, la chaîne mitochondriale utilise 80 à 90 % de l'oxygène cellulaire qu'elle réduit en eau par l'apport de 4 électrons au niveau de la cytochrome oxydase. Les substrats réducteurs fournis par le cycle de Krebs et l'oxydation des acides gras sont des donneurs d'électrons qui sont transportés via une série de couples oxydo-réducteurs associés aux complexes enzymatiques I à IV de la membrane mitochondriale interne: NADH ubiquinone oxydoréductase (I), succinate ubiquinone oxydoréductase (II), ubiquinol-cytochrome C oxydoréductase (III) et cytochrome C oxydase (IV). Ce transfert d'électrons, couplé à un gradient de protons au niveau des complexes I, II et IV, fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATPsynthétase. Durant l'anoxie, la respiration mitochondriale est bloquée, le gradient de protons s'effondre avec un arrêt du fonctionnement de l'ATPsynthétase et de la production d'ATP (Lehninger *et al.*, 1993). Pour les cellules à forte activité métabolique, le déficit en fourniture d'ATP n'est généralement pas compensé par la glycolyse. Le rendement de celle-ci en ATP est faible comparé à celui de la mitochondrie et il y a épuisement rapide des réserves en glucose et en glycogène. Le catabolisme de l'ATP, via la dégradation en ADP et en AMP, puis en adénosine et en inosine monophosphate et finalement en inosine, provoque une chute rapide de la concentration cellulaire en nucléotides adénylés. A la réoxygénation, l'adénosine et l'inosine monophosphate peuvent reformer de l'AMP. Mais, si la dégradation de l'inosine a atteint le stade de l'acide urique, le processus est irréversible. Le dernier point de récupération se situe au niveau de l'hypoxanthine qui peut encore être reconvertie en inosine monophosphate (Roy et McCord 1982).

4.2.2. Augmentation du Ca^{2+} cytosolique

L'ATP joue un rôle primordial dans le fonctionnement des pompes Ca^{2+} -ATPase qui maintiennent une valeur élevée du rapport Ca^{2+} -extracellulaire/ Ca^{2+} -intracellulaire (Ca^{2+} cytosolique $< 1 \mu M$ en conditions normales). La chute des concentrations intracellulaires en ATP entraîne un dysfonctionnement des pompes ioniques (Na^+K^+ et Ca^{2+} -ATPases) de la membrane plasmique et de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique (Harris *et al.*, 1981 ; Saris et Eriksson, 1995). Il y a augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} ce qui entraîne des perturbations biochimiques comme l'altération de la perméabilité membranaire conduisant au gonflement et à l'œdème cellulaires et comme l'activation d'enzymes telles que les phospholipases, responsables de la libération d'acides gras et de la modification de

perméabilité membranaire, ainsi que les NOSynthases et les protéases à sérine. Une de ces protéases permet la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase productrice de RNOS (Roy et McCord, 1982). En temps normal, la xanthine déshydrogénase intervient aux derniers stades du catabolisme purique et oxyde successivement l'hypoxanthine (accumulée suite à la synthèse réduite d'ATP) en xanthine et ensuite en acide urique. Les électrons libres de chaque étape sont acceptés par les flavine adénine dinucléotide (FAD) et nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺).

Une autre conséquence de l'augmentation du Ca²⁺ cytosolique lors de l'ischémie est l'accumulation de cet ion dans la mitochondrie. L'accumulation dans la matrice mitochondriale de Ca²⁺, de phosphate inorganique et l'action réductrice du FAD amènent l'ouverture transitoire d'un pore non spécifique de la membrane mitochondriale interne. Ce phénomène, appelé transition de perméabilité mitochondriale, provoque la décharge des gradients en ions et un découplage mitochondrial. Cette transition de perméabilité paraît favorisée par la production de RNOS, et particulièrement par celle du peroxy-nitrite (Zoratti et Szabo, 1995 ; Kowaltowski *et al.*, 1996).

4.2.3. Production des RNOS au niveau mitochondrial et cytosolique

Il est admis depuis les années 1970 que, en conditions respiratoires normales, $\pm 2\%$ de l'O₂ réduit par la mitochondrie forment l'anion superoxyde (et son produit de dismutation le peroxyde d'hydrogène) par réduction monoélectronique de l'oxygène (Boveris et Chance, 1973). Dans les conditions normales, les espèces oxygénées activées sont éliminées ou maintenues à un niveau bas par les systèmes protecteurs endogènes (comme la Mn-SOD caractéristique des mitochondries). En situation d'anoxie-réoxygénation, le transport d'électrons à travers la chaîne respiratoire est perturbé, ce qui conduit à une production élevée d'anion superoxyde. Cette production s'accroît au moment de la réoxygénation : l'oxygène diffuse vers l'ubiquinone où il est réduit en anion superoxyde (Cadenas *et al.*, 1977). Une production de RNOS serait également induite par le cytochrome C libéré à partir de la membrane mitochondriale interne au cours de l'anoxie (Cai et Jones, 1998). Les phénomènes d'anoxie, en activant les NOSynthases (par l'augmentation du Ca²⁺ notamment) augmentent la production mitochondriale de NO[•] (Ghafourifar et Richter, 1997 ; Giulivi *et al.*, 1998). Ce dernier exerce une double action de modulation de la respiration mitochondriale (par interaction inhibitrice avec les cytochromes) et de formation de peroxy-nitrite (ONOO⁻) par réaction avec l'anion

superoxyde produit simultanément. ONOO^- est un oxydant puissant capable d'altérer les complexes respiratoires, d'induire la transition de perméabilité mitochondriale et est souvent considéré comme responsable de l'apoptose (par activation des procaspases) (Zoratti et Szabo, 1995 ; Kowaltowski *et al.*, 1996 ; Valdez *et al.*, 2000). Globalement, on peut résumer les effets intramitochondriaux des RNOS par une inhibition de la respiration, une induction de la transition de perméabilité et des altérations de l'ADN mitochondrial (mutation du gène de la SOD).

Dans le cytosol, la production de RNOS est attribuée le plus souvent au fonctionnement de la xanthine oxydase, formée à partir de la xanthine déshydrogénase (présente dans la plupart des cellules) sous l'effet d'une action protéolytique induite par l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique lors de l'anoxie (Roy et McCord 1982). La xanthine oxydase transforme l'hypoxanthine en acide urique en utilisant l'oxygène moléculaire qu'elle transforme en anion superoxyde par réduction monoélectronique. Cet anion superoxyde est à la base de la formation du peroxyde d'hydrogène et d'autres RNOS. Les effets nocifs de la xanthine oxydase seront donc à leur maximum au moment de la réoxygénation. La NAD(P)H oxydase (ou une enzyme de structure apparentée) des cellules endothéliales (et d'autres cellules) peut produire l'anion superoxyde tout comme celle des phagocytes, mais à un niveau nettement plus bas (Babior, 1999 ; Griendling *et al.*, 2000). L'anoxie activerait le fonctionnement de ces NAD(P)H-oxydases. Il ne faut cependant pas négliger la production intracellulaire de RNOS par d'autres systèmes enzymatiques comme les NOSynthases (qui, outre le NO^* , peuvent produire l'anion superoxyde dans des conditions de déficit en cofacteur) et les cyclo-et lipoxygénases. En outre, il faut tenir compte des RNOS produits par les phagocytes (monocytes/macrophages et neutrophiles). Ceux-ci sont attirés par les facteurs chimiotactiques libérés par les cellules altérées, piégés par les récepteurs cellulaires surexprimés au cours de l'anoxie-réoxygénation (sur les cellules endothéliales notamment) et activés *in situ* (Griendling *et al.*, 2000).

D'une manière générale, on admet qu'en cas d'anoxie prolongée, les concentrations en RNOS sont élevées et la cellule meurt par nécrose à la suite d'altérations fonctionnelles aiguës. Lors d'anoxie modérée, les concentrations en RNOS sont faibles et il y aurait mort par apoptose sans inflammation et sans activation des phagocytes (Chandra *et al.*, 2000). Le rôle des RNOS dans le déclenchement de l'apoptose lors de l'anoxie-réoxygénation reste cependant discuté ; on leur attribue parfois un rôle anti-apoptotique puisqu'ils peuvent inactiver les caspases par oxydation ou par S-nitrosylation. Le NO^* peut ainsi réguler l'activité physiologique et biologique d'un

grand nombre de protéines au niveau de diverses enzymes, des canaux ioniques, des protéines G et des facteurs de transcription. Le rôle du peroxy-nitrite dans l'apoptose reste également discuté: on lui attribue plutôt un effet nécrotique (mort cellulaire par oxydation) (Gow *et al.*, 2000).

5. TRANSLOCATION BACTERIENNE, ABSORPTION D'ENDOTOXINES ET D'ENZYMES DIGESTIVES

La muqueuse intestinale fait office de barrière mais il peut se produire, en cas de lésion ischémique ou inflammatoire, une résorption de bactéries et d'endotoxines vers la circulation générale (Moore *et al.*, 1981; King et Gerring, 1988; Fessler *et al.*, 1989). L'endotoxine, aussi appelée LPS, est la portion lipopolysaccharidique de la membrane externe des bactéries gram négatives. En cas de lésions de la muqueuse intestinale, une entrée massive d'endotoxines dans les capillaires drainés par la veine porte peut dépasser la capacité hépatique à les éliminer. Une entrée des endotoxines dans les vaisseaux lymphatiques entraîne leur dissémination via le canal thoracique. En cas de lésion majeure de la paroi intestinale, les endotoxines arrivent dans la cavité péritonéale et sont résorbées directement vers la circulation périphérique (Moore *et al.*, 1981; McClure *et al.*, 1982).

Hormis les LPS, d'autres substances comme les enzymes digestives, surtout d'origine pancréatique, peuvent être résorbées. En effet, diverses études ont révélé que des patients en état de choc présentent des taux plasmatiques de trypsine immuno-réactive, de trypsine enzymatiquement active, d'amylase et de lipase similaires aux patients souffrant de pancréatite aiguë (Deby-Dupont *et al.*, 1984; Nicod *et al.*, 1985). Récemment, on a montré que les enzymes pancréatiques entrent en contact très étroit de la muqueuse intestinale lors de lésion ischémique, ce qui induit la formation d'activateurs de cellules inflammatoires. Cette activation cellulaire peut contribuer à la dispersion de l'inflammation dans l'organisme à partir du phénomène local d'ischémie (Schmid-Schonbein *et al.*, 2001).

6. ACTIVATION DES GRANULOCYTES *IN SITU*

Les granulocytes (PMN) activés sont une autre source de RNOS et d'enzymes lytiques. C'est d'abord au niveau du myocarde que l'implication des PMN dans la formation de lésions d'ischémie – reperfusion a été démontrée (Romson *et al.*, 1983). Cette accumulation intra-

vasculaire de neutrophiles, observée lors de l'ischémie, est encore accentuée lors de la reperfusion au niveau du cœur et des muscles squelettiques, ce qui mène à une obstruction mécanique des capillaires et au phénomène de « no reflow » (Engler *et al.*, 1986).

On observe également lors d'ischémie – reperfusion intestinale une accumulation de neutrophiles, (Grisham *et al.*, 1986 ; Zimmermann *et al.*, 1990). Les lésions micro-vasculaires semblent liées à l'arrivée et à l'adhésion de PMN puisqu'une déplétion en PMN ou une inhibition de leur adhésion les supprime. Ces observations indiquent que ce n'est pas seulement l'anion superoxyde produit lors de l'ischémie – reperfusion de l'intestin qui est à la base des lésions (Hernandez *et al.*, 1987), mais bien l'activité des PMN et des RNOS dérivés (Granger, 1988 ; Grisham et Granger, 1988). En outre, au cours de l'ischémie – reperfusion intestinale, les PMN présents dans des conditions normales sont également activés et contribuent aux lésions de la muqueuse (Kubes *et al.*, 1992). L'activation massive des PMN peut, comme l'absorption des endotoxines et des enzymes digestives, contribuer à la dispersion de la réaction inflammatoire dans l'organisme.

6.1. Mécanismes d'adhésion et d'extravasation des PMN

Les études portant sur les mécanismes d'adhésion et d'extravasation des PMN montrent que le facteur agrégeant les plaquettes (« platelet-activating factor » [PAF]) joue un rôle important. Un traitement par des anticorps dirigés contre les récepteurs du PAF diminue significativement le taux d'adhésion et d'extravasation des PMN au niveau de vaisseaux mésentériques soumis à une phase d'ischémie – reperfusion (Kubes *et al.*, 1990). Plusieurs voies de formation du PAF peuvent être envisagées. Une oxydation d'alkyl phosphatidylcholines polyinsaturés peut survenir et générer de manière incontrôlée un lipide « PAF-like » pouvant se lier au récepteur PAF. En outre, l'ischémie provoque l'accumulation intracellulaire de Ca^{2+} et donc l'activation des enzymes Ca^{2+} -dépendantes, parmi lesquelles se trouve la phospholipase A2 qui libère l'acide gras en position 2 du phospholipide et laisse un phospholipide prêt à être transformé en PAF par la lysoPAF-acétyltransférase (synthèse enzymatique régulière du PAF) (Prescott *et al.*, 2000).

6.2. Implication des granulocytes chez le cheval

Chez le cheval, le nombre de leucocytes est très élevé au niveau de la paroi intestinale du côlon alors que le jéjunum et l'iléon en sont presque dépourvus. L'activité de base de la MPO est donc nettement plus élevée au niveau du gros intestin qu'au niveau de l'intestin grêle (Moore *et al.*, 1994 ; Yarbrough *et al.*, 1994 ; Blikslager *et al.*, 1997). Des études d'ischémie – reperfusion ont montré une augmentation significative du nombre de PMN de la muqueuse et des veinules de la sous-muqueuse du gros intestin (Moore *et al.*, 1994) ainsi qu'une augmentation significative de l'activité de la MPO (Yarbrough *et al.*, 1994). Mais l'implication exacte des PMN circulants ou présents au niveau de l'intestin dans la formation des lésions n'est pas claire (Van Hoogmoed *et al.*, 2001).

7. CONSEQUENCES A DISTANCE DE L'OBSTRUCTION INTESTINALE

7.1. Hypoperfusion splanchnique

L'hypotension systémique observée en cas de choc endotoxique ou lors de choc hypovolémique peut mener à une hypoperfusion splanchnique qui peut accentuer les lésions intestinales et également mener aux lésions d'autres organes comme les reins, le foie et le pancréas. En outre, la compression par la distension des organes digestifs, l'inflammation péritonéale et la manipulation en chirurgie peuvent contribuer à l'extension des lésions vers d'autres organes. En médecine humaine et en expérimentation animale, il apparaît que le pancréas est un organe particulièrement sensible à l'hypoperfusion en cas de choc (Lamy *et al.*, 1987 ; Hildebrand *et al.*, 2000), si bien que le terme « pancréas de choc » lui est attribué. Suite aux états de choc sévères, le taux plasmatique de certaines enzymes pancréatiques peut augmenter (Deby-Dupont *et al.*, 1984), mais rien de tel n'a été démontré chez le cheval.

7.2. Familles de protéases et leur origine

Les protéases sont des enzymes qui catalysent la dégradation des protéines et des polypeptides. On distingue quatre types de protéases selon leurs fonctions et leurs structures : les protéases à sérine, à cystéine, à aspartate et les métallo-protéases. Les premières sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau du site actif de l'enzyme. Ce sont des endoprotéases qui scindent les protéines au niveau de sites spécifiques dans la chaîne peptidique (Rinderknecht,

1993). Cette famille comprend de nombreuses protéases d'origine leucocytaire et pancréatique dont la trypsine, la chymotrypsine, les kallikréines, les élastases pancréatique et leucocytaire et la cathepsine G.

Parmi les protéases à cystéine, citons les caspases actives dans l'apoptose ; pour les protéases à aspartate citons la cathepsine D. Les métalloprotéases, aussi appelées métalloprotéinases matricielles (MMP) existent dans les phagocytes ainsi que dans beaucoup d'autres cellules et tissus. Les PMN contiennent la collagénase (MMP-1), la gélatinase (MMP-2) et la stromélysine (MMP-3). Le pancréas exocrine sécrète les carboxypeptidases.

Les sources majeures de protéases *in vivo* sont le pancréas (activité au niveau de l'intestin grêle), les granulocytes (activité locale au niveau du site d'activation leucocytaire) et les lysosomes cellulaires de toutes les cellules (activité intra-cellulaire et intra-organite, pour la dégradation de débris intracellulaires) (Borgstrom et Haglund, 1989).

7.2.1. Caractéristiques des enzymes pancréatiques et en particulier de la trypsine

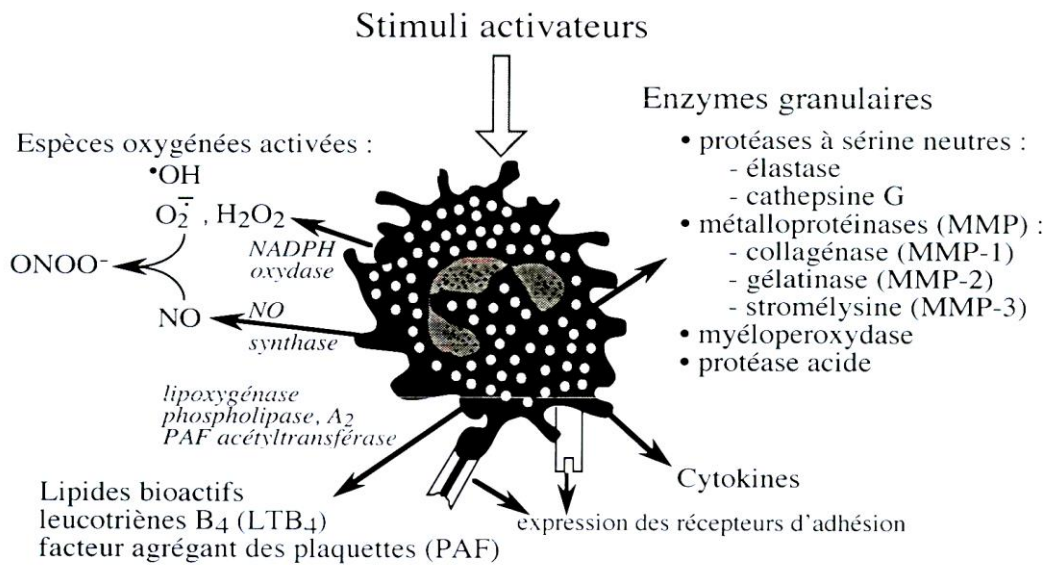
Les enzymes pancréatiques sont sécrétées sous forme de précurseur inactif, appelé zymogène ce qui évite l'autodigestion du pancréas. C'est dans la lumière intestinale que le trypsinogène est activé en trypsine sous l'action de l'entéropeptidase ou entérokinase sécrétée par les entérocytes du duodénum. La trypsine a un rôle clef dans l'activation de tous les autres zymogènes, y compris le trypsinogène (auto-activation) (Rinderknecht, 1993). Chez l'homme, la trypsine existe sous trois formes immunologiques différentes (les trypsines cationique et anionique et la mésotrypsine) avec des similitudes d'action : c'est la forme cationique qui est la plus abondante ($\pm 60\%$). La trypsine est exclusivement pancréatique à l'exception de l'acrosine, enzyme située dans l'acrosome des spermatozoïdes, qui présente une activité enzymatique identique à celle de la trypsine et une réaction immunologique croisée avec la trypsine pancréatique (Deby-Dupont, 1987). On mentionne aussi des enzymes qualifiées de « trypsin-like » dans de nombreuses cellules de tissus non pancréatiques : elles exercent une activité de type « trypsine », mais leur structure reste encore mal connue. L'activité enzymatique est dirigée contre les groupes carboxyles des résidus lysine et arginine et est favorisée par la présence de calcium (Rinderknecht, 1993). La lipase, qui existe aussi sous une forme gastrique et intestinale, et l' α -amylase, dont il existe une forme salivaire, sont les deux

enzymes pancréatiques les plus largement étudiées comme marqueur d'un trouble du pancréas (Rinderknecht, 1993). La trypsine, bien que plus spécifique, est moins étudiée.

7.3. Enzymes leucocytaires et leur activité

Les PMN contiennent de grandes quantités de protéases comme les protéases à sérine, élastase et cathepsine G, les métalloprotéinases, collagénase, gélatinase et stromélysine, et une protéase acide. Ils sont aussi équipés d'autres enzymes comme la phospholipase. Ces enzymes sont libérées dans le phagolysosome qui se constitue suite à l'adhésion et à l'ingestion de microorganismes par le PMN activé. Ces enzymes contribuent à les détruire avec l'action conjointe des RNOS produits par la NADPH oxydase, la NO synthase et la MPO (Fig. 5).

Fig. 5 Principaux médiateurs produits par les PMN activés (d'après Fujishima et Aikawa, 1995).



7.4. Antiprotéases : types et origine.

Afin d'éviter une destruction tissulaire massive dépassant l'action locale du « turn-over » tissulaire ou la destruction locale de microorganismes, des antiprotéases plasmatiques d'origine surtout hépatique et des antiprotéases produites par d'autres cellules vont se lier aux protéases et inhiber leur site actif en formant un complexe stable, mais parfois de durée de vie limitée. Les principales antiprotéases endogènes sont l' α_1 -protéinase inhibiteur ou l' α_1 -antitrypsine, l' α_2 -macroglobuline, l' α_1 -antichymotrypsine, l'anti-thrombine III et l' α_2 -antiplasmine.

L' α_1 -protéinase inhibiteur (ou α_1 -antitrypsine) représente environ 90 % de la capacité d'inhibition du plasma. L'enzyme humaine est une glycoprotéine de 55 kDa. Elle se lie à diverses protéases comme la trypsine, la chymotrypsine et surtout l'élastase ainsi qu'aux protéases granulocytaires et microbiennes. La formation d'un complexe provoque le détachement d'un fragment carboxy-terminal qui possède un caractère chimiotactique important. Les complexes formés sont totalement inactifs mais de durée de vie limitée (un temps de demi-vie de seulement 3,5 heures) si bien que l'enzyme est libérée active et peut se lier à l' α_2 -macroglobuline. Ses taux plasmatiques augmentent suite à l'induction de la phase aiguë lors du processus inflammatoire (Rinderknecht, 1993). Son rôle majeur est d'inhiber l'élastase des neutrophiles dans l'inflammation pulmonaire (Stockley, 1999).

L' α_2 -macroglobuline est une glycoprotéine de grande taille (720 kDa). Les hépatocytes en sont la source majeure, mais les macrophages en sécrètent également. Elle inhibe les endoprotéases des quatre familles mentionnées ci-dessus (sérine, cystéine ou thiol, aspartate et métalloprotéinase) et forme des complexes stables éliminés rapidement (en 10 minutes) via le système réticulo-endothélial. La particularité des complexes α_2 -macroglobuline-protéase réside dans le fait qu'ils gardent une activité enzymatique résiduelle de 50 – 80 % vis à vis de peptides de taille réduite. Le complexe α_2 -macroglobuline-trypsine p.ex. est capable d'activer le trypsinogène et le chymotrypsinogène et de transformer d'autres enzymes ou hormones. Une autre fonction importante de l' α_2 -macroglobuline est la régulation de diverses cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, facteurs de croissance) dont certains facteurs se lient préférentiellement à l' α_2 -macroglobuline native alors que d'autres préfèrent l' α_2 -macroglobuline liée aux protéases (Rinderknecht, 1993 ; LaMarre *et al.*, 1991). La trypsine se lie à 85 % à l' α_2 -macroglobuline et à 15 % à l' α_1 -protéinase inhibiteur.

Il existe encore diverses autres antiprotéases sécrétées localement (« secretory leukoproteinase inhibitor ; SLPI » ; « pancreatic secretory trypsin inhibitor ; PSTI »), des antiprotéases tissulaires (aprotinine ; inhibiteur tissulaire des métallo-protéinases 2 « TIMP ») ou encore d'autres antiprotéases plasmatiques comme l'inter- α_1 -trypsin-inhibiteur (ITI) et l' α_1 -antichymotrypsine (Fritz, 1988 ; Mulligan *et al.*, 1993 ; Rinderknecht, 1993 ; Jin *et al.*, 1997 ; Mulligan *et al.*, 2000).

7.5. Présence d'enzymes pancréatiques dans la circulation générale

Des patients en état de choc présentent des taux plasmatiques de trypsine immuno-réactive, de trypsine enzymatiquement active, d'amylase et de lipase similaires aux patients souffrant de pancréatite aiguë. Des lésions pancréatiques sont associées au syndrome de détresse respiratoire aiguë (SRDA). Une diminution drastique en α_2 -macroglobuline et une augmentation progressive en α_1 -protéinase inhibiteur sont également observées (Deby-Dupont *et al.*, 1984 et 1988 ; Nicod *et al.*, 1985). Diverses interventions chirurgicales majeures peuvent aussi s'accompagner de taux élevés en trypsine et lipase. Des expérimentations animales où l'on induit un choc endotoxique ou hémorragique ont démontré le même phénomène (Lamy *et al.*, 1987 ; Fernandez-del Castillo *et al.*, 1991 ; Florholmen *et al.*, 1985a et b). A l'inverse, on observe également des lésions pulmonaires dans des cas de pancréatite aiguë accompagnée de taux plasmatiques élevés en enzymes pancréatiques (Hartwig *et al.*, 1999).

L'augmentation des enzymes pancréatiques dans la circulation générale pourrait être due à une résorption intestinale accrue. Une augmentation de la perméabilité de l'intestin grêle peut en effet résulter d'un phénomène d'ischémie suite à un état de choc avec hypotension sévère. L'absence du mucus permet le contact direct de la trypsine avec la muqueuse intestinale. La trypsine favorise la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, ce qui augmente la production d'anion superoxyde (Parks *et al.*, 1985 ; Bounous, 1986). La défaillance rénale par contre n'augmente que très faiblement les taux plasmatiques en trypsine (Koop, 1984). Lors d'hypoperfusion splanchnique généralisée, l'ultra-structure du pancréas peut être lésée. Dans ce cas, il pourrait libérer des protéases et contribuer au déséquilibre protéase – antiprotéase.

7.5.1. Effets systémiques de la trypsine

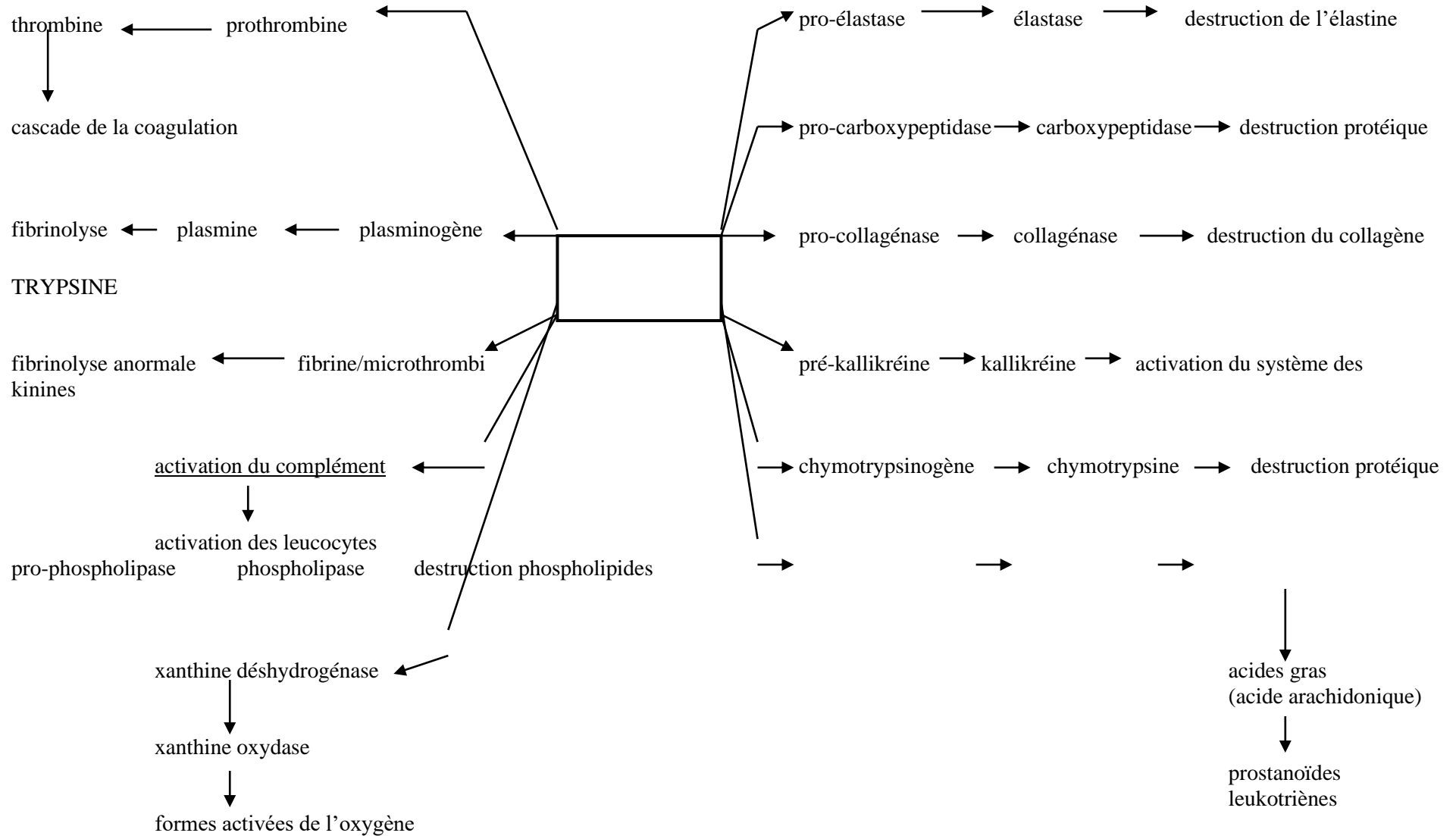
La trypsine stimule la sécrétion du TNF- α et de l'IL-1 β par les macrophages péritonéaux (Lundberg *et al.*, 2000). Elle active le complément par clivage de la protéine C3 qui, à son tour, active les PMN (Lasson et Ohlson, 1982 ; Acioli *et al.*, 1997) et augmente l'expression de molécules d'adhésion de ceux-ci si bien que leur migration est accrue (Hartwig *et al.*, 2001). Les PMN activés sont capables de convertir le trypsinogène en trypsine (Hartwig *et al.*, 1999). La trypsine libre peut activer la cascade de la coagulation via l'activation de récepteurs des cellules endothéliales, ce qui induit la formation de facteur tissulaire (Langer *et al.*, 1999 ; Alm *et al.*, 1999). En transformant le plasminogène en plasmine, elle induit la fibrinolyse (Satake et

al., 1973). Elle peut aussi agir directement sur des microthrombi et sur la fibrine en formant des produits toxiques de la fibrinolyse (Harpel *et al.*, 1973 ; Aasen *et al.*, 1982). Elle agit sur la production de peptides actifs comme le « myocardial depressant factor » (Lefer et Barenholz, 1972). En cas d'effondrement des taux plasmatiques en α_2 -macroglobuline et d'activation des PMN qui diminuent l'activité de l' α_1 -protéinase inhibiteur, il pourrait exister de la trypsine libre dans le plasma. La figure 6 (p.72) résume l'ensemble des effets de la trypsine dans l'activation des proenzymes pancréatiques et dans la circulation générale.

Fig. 6 Effets de la trypsine au niveau sanguin et dans l'activation des proenzymes du pancréas.

effets en dehors du pancréas

activation à l'intérieur du pancréas



7.6. Perturbation de l'équilibre protéases – antiprotéases

Une perturbation de l'équilibre protéases – antiprotéases peut résulter de l'augmentation tissulaire locale ou plasmatique générale des protéases ou, à l'inverse, de la déficience de manière permanente ou transitoire des antiprotéases. En ce qui concerne les protéases générées par les PMN, c'est surtout l' α_1 -protéinase inhibiteur qui semble être la plus importante. On observe *in vivo* une stimulation de sa production par les monocytes induite par les LPS, l'IL-1 β et le TNF- α (Barbey-Morel *et al.*, 1987 ; Perlmutter *et al.*, 1989 ; Knoell *et al.*, 1998).

D'autre part, les antiprotéases (α_2 -macroglobuline, α_1 -protéinase inhibiteur et SLPI) sont sensibles à l'action oxydante des RNOS ce qui entraîne une perte de leur activité et provoque un déséquilibre de la balance protéase – antiprotéase (Deby-Dupont, 1987 ; Deby-Dupont *et al.*, 1994 ; Vogelmeier *et al.*, 1997).

8. DEVELOPPEMENT DU CHOC ENDOTOXIQUE

Lors d'ischémie intestinale, des LPS sont résorbées vers la circulation générale. A ce niveau, elles peuvent se lier aux lipoprotéines de haute densité, ce qui prolonge leur durée de vie mais réduit leurs effets nocifs (Baumberger *et al.*, 1991). Des protéines de liaison spécifiques aux LPS, les « LPS binding proteins » (LBP) se lient également aux LPS et facilitent la liaison aux phagocytes. Ceux-ci possèdent des récepteurs CD14 membranaires qui provoquent soit l'internalisation soit la transduction du signal à l'intérieur de la cellule (Gegner *et al.*, 1995). C'est le récepteur « Toll-like 4 » (et 2) qui possède une portion transmembranaire à la base de l'activation du phagocyte (Ulevitch, 1999 ; da Silva Correia *et al.*, 2001). Les endotoxines phagocytées par les macrophages sont dégradées en acides gras et en chaînes polysaccharidiques. Elles activent diverses fonctions des macrophages comme leurs sécrétions, la phagocytose et leurs fonctions bactéricides (Ulevitch et Tobias, 1995). Les macrophages activés libèrent une cascade de médiateurs aux effets variés. Jusqu'à présent, on a considéré que ce sont surtout les monocytes qui sont les cellules les plus activées par les LPS. Ce seraient ces cellules qui auraient le rôle le plus important dans la pathogénie de l'endotoxémie par la libération de cytokines et d'autres médiateurs (Maier et Ulevitch, 1981). Les PMN et les cellules endothéliales activées par les LPS auraient également un rôle important (Vosbeck *et al.*, 1990 ; Pugin *et al.*, 1995a).

8.1. Médiateurs libérés par l'activation des monocytes

Les cytokines sont les principaux médiateurs libérés par les monocytes. Pour la plupart, ils ont des effets pro-inflammatoires. Aux cytokines, il faut ajouter de nombreux autres médiateurs dont les eicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique, le PAF, des polypeptides, des phospholipides et des enzymes lytiques. Ces médiateurs ont des activités diverses et surtout la faculté d'activer d'autres cellules ou de favoriser la synthèse et la sécrétion d'autres cytokines (réaction en cascade). D'autres médiateurs par contre enrayent la cascade inflammatoire. Seuls les médiateurs les plus étudiés seront cités ci-dessous.

8.1.1. Facteur nécrosant des tumeurs ou « tumor necrosis factor α » (TNF- α)

Ce polypeptide de 17 kDa est produit par des monocytes stimulés par des LPS. Son activité passe essentiellement par la stimulation d'autres cellules (PMN, cellules endothéliales) et d'autres monocytes avec production de substances pro-inflammatoires comme les eicosanoïdes (prostaglandines et thromboxane A_2) (Kettelhut *et al.*, 1987) et l'interleukine-1 (Bachwich *et al.*, 1986 ; Nawroth *et al.*, 1986). Les cellules endothéliales activées produisent des protéines d'adhésion pour les PMN, du facteur tissulaire (facteur procoagulant) et diminuent la production de thrombomoduline (Nawroth et Stern, 1986). Les PMN activés augmentent leur adhésion aux cellules endothéliales (Gamble *et al.*, 1985). Suite à la présence de LPS dans la circulation générale, le taux de TNF- α augmente rapidement et atteint un pic après 90 à 120 minutes (Hesse *et al.*, 1988). Des taux élevés de TNF- α ont été mis en évidence chez des chevaux souffrant d'obstructions étranglées ou de lésions inflammatoires sévères du tractus digestif (Morris *et al.*, 1991). L'administration de TNF- α reproduit la majorité des signes cliniques et perturbations physiologiques du choc endotoxique (Tracey *et al.*, 1986). L'administration d'anticorps anti-TNF- α prévient la majorité des perturbations induites par les LPS, sauf l'augmentation de la température rectale, l'augmentation de la fréquence respiratoire et l'élévation des concentrations en thromboxane A_2 (Tracey *et al.*, 1987 ; Cargile *et al.*, 1995a et b).

8.1.2. Interleukine 1 β (IL-1 β)

Cette cytokine est produite surtout par les monocytes mais aussi par les PMN et les cellules endothéliales. Elle provoque la prolifération des lymphocytes T sensibilisés, mais induit également la synthèse hépatique des protéines de la phase aiguë (Morris, 1991). L'IL-1 β est un activateur des neutrophiles et des cellules endothéliales (Cybulsky *et al.*, 1988 ; Pugin *et al.*, 1995b). Un traitement par des antagonistes des récepteurs de l'IL-1 réduit la mortalité due au choc endotoxique (Ohlsson *et al.*, 1990).

8.1.3. Interleukine 6 (IL-6)

Cette cytokine est produite par les monocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales en réponse à l'activation par le TNF- α et l'IL-1 β après stimulation par les LPS. Elle stimule la différenciation finale des lymphocytes B (production d'anticorps) et la production des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes. Dans une étude de Barton et Collatos (1999) le taux d'IL-6 est plus élevé dans le liquide péritonéal que dans le plasma chez les chevaux en coliques. La concentration en IL-6 est plus souvent augmentée que celle des LPS et du TNF- α , et ce sont également les concentrations en IL-6 (> à 60 U/mL) qui possèdent la meilleure valeur pronostic (mortalité).

8.1.4. Interleukine 8 (IL-8)

Cette cytokine est produite par les monocytes, mais également par l'épithélium pulmonaire, les cellules endothéliales et les PMN activés. Elle agit comme facteur chimiotactique et activateur des PMN, mais induit également, après une brève neutropénie, une stimulation importante de la libération de granulocytes matures, ce qui entraîne rapidement une neutrophilie (Vetillard *et al.*, 1999).

8.1.5. Interleukine 10 (IL-10)

C'est une cytokine aux effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs qui est produite par les monocytes et les lymphocytes T (Fiorentino *et al.*, 1991). Ses concentrations plasmatiques augmentent lors du sepsis. Etant donné ses effets anti-inflammatoires, elle pourrait avoir un effet bénéfique (Hawkins *et al.*, 1998 ; Huber *et al.*, 2000) mais on constate que des

concentrations élevées, lors de choc septique, sont associées à une mortalité accrue (Oberholzer *et al.*, 2002).

8.1.6. Eicosanoïdes

Les eicosanoïdes font partie d'une famille d'acides gras polyinsaturés (de 3 à 5 doubles liaisons) à 20 carbones, cycliques (prostanoïdes) et non cycliques. Ils sont tous biologiquement actifs. Une grande partie des eicosanoïdes dérivent de l'acide arachidonique libéré par l'action de la phospholipase A₂. Il existe deux familles d'enzymes. La première comprend les cyclooxygénases (COX) qui se présentent sous deux isoformes, la COX-1 constitutive et la COX-2 inducible, et forment les prostaglandines (PG) et le thromboxane (TX) (Vane *et al.*, 1994). La cyclooxygénase-1 constitutive produit des prostaglandines à un taux basal. Les prostaglandines interviennent dans la régénération de la muqueuse intestinale endommagée et leur production n'est pas augmentée par l'inflammation (Campbell et Bliklager, 2000). La COX-2, par contre, est induite par l'inflammation. Elle est à la base d'une production de quantités importantes de prostaglandines (E₂, F₂, prostacycline) qui possèdent surtout des propriétés vasodilatatrices et d'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Elle est également à la base du thromboxane A₂ (vasoconstriction et hypertension pulmonaire, agrégation plaquettaire) (Morris, 1991).

La deuxième famille est constituée par les lipoxygénases qui forment les leucotriènes. Les leucotriènes C₄, D₄ et E₄ sont des vaso- et bronchoconstricteurs puissants et augmentent la perméabilité capillaire (Drazen *et al.*, 1980; Leff, 2001). Ils augmentent aussi la production de PG et TXA₂. Le leucotriène B₄ est un agent chimiotactique puissant et active le métabolisme oxydant des PMN (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980; Lafars *et al.*, 1999).

8.1.7. Facteur tissulaire ou thromboplastine

Il est non seulement sécrété par les monocytes, mais également par les cellules endothéliales en réponse aux LPS, au TNF- α ou à l'IL-1 β . Son effet majeur est d'initier la thrombose microvasculaire (Maier et Ulevitch, 1981 ; Barton *et al.*, 1996 ; Karimova et Pinsky, 2001).

8.1.8. Facteur agrégeant des plaquettes (PAF)

Ce phospholipide est exprimé à la surface de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales, les plaquettes, les neutrophiles, les basophiles et les macrophages, en réponse à divers stimuli inflammatoires. Il induit, comme son nom l'indique, l'agrégation et la dégranulation des plaquettes (Suquet et Leid, 1983), mais stimule également l'activation des PMN et des monocytes (Prescott *et al.*, 2000). Il aurait une action juxtacrine : exprimé à la surface de la cellule qui le synthétise, il agit sur des récepteurs au PAF d'autres cellules (Prescott *et al.*, 2000).

8.2. Stimulation des cellules endothéliales et des polymorphonucléaires

Les cellules endothéliales sont activées directement par les LPS et par les médiateurs comme le TNF- α et l'IL-1 β . Elles vont produire à leur tour des cytokines (IL-1 ; IL-6 ; IL-8) (Miossec *et al.*, 1986), des prostanoïdes (PGI₂, PGE₂), le facteur tissulaire (Moore *et al.*, 1987), l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) (Novotny *et al.*, 1987) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) (Sprenger et Kluft, 1987). La cellule endothéliale activée surexprime en surface les protéines d'adhésion, ce qui augmente l'adhésion des leucocytes (McEver, 1992 ; Clark et Brugge, 1995). En situation d'anoxie, les cellules endothéliales accroissent leur production de NO^{*} et d'endothéline, leur expression de récepteurs d'adhésion et l'activité de la NAD(P)H oxydase. Au cours de l'infection et du choc septique la cellule endothéliale passe donc d'un rôle anti- à un rôle pro-coagulant (Karimova et Pinsky, 2001 ; Vallet et Wiel, 2001).

En ce qui concerne les PMN, des études *in vitro* ont montré qu'une administration de LPS augmente leur capacité de sécrétion de RNOS (Guthrie *et al.*, 1984) et la libération de leurs enzymes lysosomiales (Haslett *et al.*, 1985). Des études de l'activation leucocytaire faites par chimioluminescence (CL) montrent une variabilité (parfois augmentation, parfois même intensité, parfois encore diminution) de la réponse après administration de LPS aux PMN isolés (Hendricks *et al.*, 1983 ; Zheng *et al.*, 1991 ; Benbarek *et al.*, 1997). Si, par contre, les LPS sont au préalable incubés dans du plasma (sans la présence de monocytes), il y a une activation des PMN isolés et une augmentation de la réponse en CL de manière dose-dépendante (Benbarek *et al.*, 1997 et 1998). Les LPS agiraient via l'activation du complément ou via la formation de complexes avec la protéine liant les LPS (LBP) ou les récepteurs CD14 circulants (Pugin *et al.*,

1995a). L'effet chimiotactique et activateur des LPS sur les PMN est dû aussi aux cytokines produites sous l'effet des LPS par d'autres cellules.

Signalons ici l'importance de la dégranulation (surtout au contact des cellules endothéliales) et de la libération d'enzymes lysosomiales qui vont perturber l'équilibre protéase – anti-protéase normalement indispensable pour éviter une destruction tissulaire massive. La concentration plasmatique des enzymes granulaires libérées par les PMN est le témoin de leur activation. Ce sont surtout l'élastase et la myéloperoxydase qui sont évaluées en médecine humaine (Faymonville *et al.*, 1991 ; Muller Kobold *et al.*, 2000). Ces dosages n'ont pas encore été réalisés chez le cheval.

8.3. Choc endotoxique

L'évolution de l'obstruction intestinale avec la séquestration importante de fluides qui entraîne aussi l'activation des monocytes, des cellules endothéliales et des PMN mène au développement d'un état de choc soit simplement hypovolémique ou le plus souvent endotoxique. Les perturbations observées provoquent des déséquilibres de la balance oxydant/anti-oxydant, protéase/anti-protéase et coagulation/anti-coagulation (Johnstone et Crane, 1986 ; Prasse *et al.*, 1993 ; Monreal *et al.*, 2000), ce qui peut mener à une défaillance multi-systémique et à la mort.

C. OBJECTIFS DE NOS ETUDES

Les coliques restent la première cause de mortalité chez le cheval. Il s'agit le plus souvent d'obstructions intestinales étranglées qui entraînent le développement d'un choc endotoxique irréversible. Malgré les progrès des méthodes de diagnostic, d'anesthésie, de chirurgie et de soins intensifs, le pronostic des obstructions intestinales étranglées reste mauvais. Dans les différentes études cliniques publiées, il n'existe pas de standardisation des protocoles d'examen ce qui rend difficile l'analyse des résultats. Les méthodes d'évaluation du pronostic sont variées et se basent surtout sur la dépression cardiovasculaire induite par le choc. Il n'y a pas d'étude qui propose une gradation de la gravité de la pathologie ce qui rend la comparaison entre les cas difficile. En outre, peu d'études abordent les complications et l'évolution postopératoires. La première partie de ce travail tente donc de combler ces lacunes en analysant de manière systématique plus de 200 cas d'obstruction intestinale opérés dans le service de chirurgie des grands animaux.

Etant donné le pronostic réservé et l'incidence élevée des complications postopératoires, la deuxième partie de ce travail tente d'apporter des éléments nouveaux quant à la physiopathologie de l'obstruction intestinale chez le cheval. En effet, aucune étude n'envisage le rôle potentiel joué par les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN). Afin de répondre à ces questions, nous étudierons une enzyme granulaire des neutrophiles, la myéloperoxydase (MPO). Les variations de ses taux plasmatiques au cours des obstructions intestinales peuvent être un indice de l'activation leucocytaire.

En médecine humaine, il apparaît que le pancréas est un organe particulièrement sensible à l'hypoperfusion en cas de choc, si bien que le terme « pancréas de choc » lui est attribué. L'éventualité de l'existence d'une ischémie splanchnique pouvant atteindre d'autres organes comme le pancréas n'est pas démontrée chez le cheval. Afin d'éclaircir ce sujet, nous étudions les variations des taux plasmatiques de trypsine lors d'obstruction intestinale. En outre, une étude en microscopie optique et électronique est réalisée sur des pancréas prélevés chez des chevaux euthanasiés pour obstructions intestinales et choc endotoxique irréversible.

D. BIBLIOGRAPHIE

AASEN A.O., KIERULF P., RUUD T.E., GODAL H.C., AUNE S. Studies on pathological plasma proteolysis in patients with acute pancreatitis, a preliminary report. *Acta Clin. Scand.*, 1982, **509**, 83-89.

ACIOLI J.M., ISOBE M., KAWASAKI S. Early complement system activation and neutrophil priming in acute pancreatitis: participation of trypsin. *Surg.*, 1997, **122**, 909-917.

ADAIR H.S. 3rd, GOBLE D.O., SCHMIDHAMMER J.L., SHIRES G.M. Laminar microvascular flow, measured by means of laser Doppler flowmetry, during the prodromal stages of black-walnut-induced laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**, 862-868.

ADAMS S.B., FESSLER J.F., REBAR A.H. Cytologic interpretation of peritoneal fluid in the evaluation of equine abdominal crises. *Cornell Vet.*, 1980, **70**, 232-246.

ADAMS S.B., MACHARG M.A. Neostigmine methylsulfat delays gastrique emptying of particulate markers in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 2498-2499.

AHREN C., HAGLUND U. Mucosal lesions in the small intestine of the cat during low flow. *Acta Physiol. Scand.*, 1973, **88**, 541-550.

ALLEN D., WHITE N.A., TYLER D.E. Factors for prognostic use in equine obstructive small intestinal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986, **189**, 777-780.

ALLEN D., TYLER D.A. Pathophysiology of acute abdominal disease. In : White N.A. (Ed.), *The equine acute abdomen*. Lea & Febiger : Philadelphia, 1990, 65-89.

ALM A.K., NORSTROM E., SUNDELIN J., NYSTEDT S. Stimulation of proteinase activated receptor-2 causes endothelial cells to promote blood coagulation in vitro. *Thromb. Haemost.*, 1999, **81**, 984-988.

AMES A.3rd, WRIGHT R.L., KOWADA M., THURSTON J.M., MAJNO G. Cerebral ischaemia: the no-reflow phenomenon. *Am. J. Pathol.*, 1968, **52**, 437-453.

AR'RAJAB A., DAWIDSON I., FABIA R. Reperfusion injury. *New Horiz.*, 1996, **4**, 224-234.

BABIOR B.M. NADPH oxidase: An update. *Blood*, 1999, **93**, 1464-1476.

BABIOR B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 2000, **109**, 33-44.

BACHWICH P.R., CHENSUE S.W., LARRICK J.W., KUNKEL S.L. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **136**, 94-101.

BARBEY-MOREL C., PIERCE J.A., CAMPBELL E.J., PERLMUTTER D.H. Lipopolysaccharide inhibitor and other serine proteinase inhibitors in human monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.*, 1987, **166**, 1041-1054.

BARCLAY W.P., FOERNER J.J., PHILIPS T.N. Volvulus of the large colon in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1980, **177**, 629-630.

BARTON M.H., COLLATOS C., MOORE J.N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. *Equine Vet. J.*, 1996, **28**, 382-389.

BARTON M.H., COLLATOS C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J. Vet. Intern. Med.*, 1999, **13**, 457-464.

BAUMBERGER C., ULEVITCH R.J., DAYER J.M. Modulation of endotoxic activity of lipopolysaccharide by high-density lipoprotein. *Pathobiology*, 1991, **59**, 378-383.

BAXTER G.M. Postoperative complications and long-term prognosis of the colic patient. *Proc. Ann. Conv. Am. Ass. Equine Pract.*, 1989, **35**, 39-55.

BAXTER G.M., BROOME T.E., MOORE J.N. Abdominal adhesions after small intestinal surgery in the horse. *Vet. Surg.*, 1989, **18**, 409-414.

BAXTER G.M. Recognizing and managing the postoperative complications of equine abdominal surgery. *Vet. Med.*, 1992, **87**, 1113-1120.

BAXTER G.M., HUNT R.J., TYLER D.E., PARKS A.H., JACKMAN B.R. Sutured end-to-end and stapled side-to-side jejunal anastomoses in the horse. *Vet. Surg.*, 1992, **21**, 47-55.

BEARD W.L., BERTONE A.L. Surgery of the equine small intestine. *Comp. Cont. Educ. Equine*, 1992, **14**, 1508-1513.

BECKER M., BREUER D. Ergebnisse der operativen Kolikbehandlung, dargestellt am Patientengut des Jahres 1983 der Pferdeklinik München-Riem. *Tierärztl. Prax.*, 1985, **13**, 199-204.

BECKMAN J.S., BECKMAN T.W., CHEN J., MARSHALL P.A., FREEMAN B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 1620-1624.

BECKMAN J.S., CHEN J., ISCHIROPOULOS H., CROW J.P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methodes Enzymol.*, 1994, **233**, 229-240.

BECKMAN J.S. Oxidative damage and tyrosine nitrations from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.*, 1996, **19**, 836-844.

BECKMAN J.S., KOPPENOL W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite : the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996, **271**, C1424-C1437.

BELKNAP J.K., MOORE J.N. Evaluation of heparin for prophylaxis of equine laminitis: 71 cases (1980-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **195**, 505-507.

BELKNAP J.K., BAXTER G.M. Surgical management of disorders of the equine large intestine. *Vet. Med.*, 1992, **87**, 1106-1112.

BENBAREK H., DEBY-DUPONT G., CAUDRON I., MATHY-HARTERT M., LAMY M., SERTEYN D. Experimental model for the study by chemiluminescence of the activation of isolated equine leucocytes. *Res. Vet. Sci.*, 1996, **61**, 59-64.

BENBAREK H., DEBY-DUPONT G., CAUDRON I., DEBY C., LAMY M., SERTEYN, D. Failure of lipopolysaccharides to directly trigger the chemiluminescence response of the isolated equine polymorphonuclear leucocytes. *Vet. Res. Com.*, 1997, **21**, 477-482.

BENBAREK H., DEBY-DUPONT G., CAUDRON I., GRULKE S., DEBY C., LAMY M., SERTEYN D. Interactions between lipopolysaccharides and blood factors on the stimulation of equine polymorphonuclear neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **64**, 313-322.

BERNARDI P., PETRONILLI V., DI LISA F., FORTE M. Mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.*, 2001, **26**, 112-117.

BERTONE A.L., STASHAK T.S., SULLINS K.E. Large colon resection and anastomosis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986, **188**, 612-617.

BLIKSLAGER A.T., BOWMAN K.F., HAVEN M.L., TATE Jr L.P., BRISTOL D.G. Pedunculated lipomas as a cause of intestinal obstruction in horses: 17 cases (1983-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **201**, 1249-1252.

BLIKSLAGER A.T., BOWMAN K.F., LEVINE J.F., BRISTOL D.G., ROBERTS M.C. Evaluation of factors associated with postoperative ileus in horses: 31 cases(1990-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **205**, 1748-1752.

BLIKSLAGER A.T., ROBERTS M.C., GERARD M.P., ARGENZIO R.A. How important is intestinal reperfusion injury in horses? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997a, **211**, 1387-1389.

BORGSTROM A., HALGLUND U.H. Proteases: role in mucosal injury. In : Marston A., Bulkley G.B., Fiddian-Green R.G., Haglund U.H. (Eds.), Splanchnic ischaemia and multiple organ failure. Mosby : St. Louis, 1989, 159-165.

BORREGAARD N., COWLAND J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997, **89**, 3503-3521.

BOUNOUS G. Acute necrosis of the intestinal mucosa. *Gastroenterol.*, 1982, **82**, 1457-1467.

BOUNOUS G. Pancreatic proteases and oxygen-derived free radicals in acute ischemic enteropathy. *Surg.*, 1986, **99**, 92-94.

BOVERIS A., CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 1973, **34**, 707-716.

BRISTOL D.G. The anion gap as a prognostic indicator in horses with abdominal pain. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1982, **181**, 63-65.

CADENAS E., BOVERIS A., RAGAN C.I., STOPPANI A.O.M. Production of O₂[•] radicals and H₂O₂ by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c-reductase from beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, **180**, 248-257.

CAI J., JONES D.P. Superoxide in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 11401-11404.

CAMPBELL N.B., BLIKSLAGER A.T. The role of cyclooxygenase inhibitors in repair of ischaemic-injured jejunal mucosa in the horse. *Equine Vet. J.*, 2000, **32** : Suppl, 59-64.

CARGILE J.L., McKAY R.J., DANKERT J.R., SKELLEY L. Effects of tumor necrosis factor blockade on interleukin 6, lactate, thromboxane, and prostacyclin responses in Miniature Horses given endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 1995a, **56**, 1445-1450.

CARGILE J.L., McKAY R.J., DANKERT J.R., SKELLEY L. Effect of treatment with a monoclonal antibody against tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic, and circulating TNF responses of Miniature Horses given endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 1995b, **56**, 1451-1459.

CARRERAS M.C., PARGAMENT G.A., CATZ S.D., PODEROSO J.J., BOVERIS A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.*, 1994, **341**, 65-68.

CHANDRA J., SAMALI A., ORRENIUS S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **29**, 323-333.

CHEADLE W.G., VITALE G.C., MACKIE C.R., CUSCHIERI A. Prophylactic postoperative nasogastric decompression. A prospective study of its requirements and the influence of cimetidine in 200 patients. *Ann. Surg.*, 1985, **202**, 361-366.

CHEATHAM M.L., CHAPMAN W.C., KEY S.P., SAWYERS J.L. A meta-analysis of selective versus routine nasogastric decompression after elective laparotomy. *Ann. Surg.*, 1995, **221**, 469-476.

CHIU C.J., MCARDLE A.H., BROWN R., SCOTT H.J., GURD F.N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch. Surg.*, 1970, **101**, 478-483.

CLARK E.A., BRUGGE J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 1995, **268**, 233-239.

COCHRANE C.G., SPRAGG R.G., REVAK S.D., COHEN A.B., McGUIRE W.W. The presence of neutrophil elastase and evidence of oxidation activity in bronchoalveolar lavage fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1983, **127**, 525-527.

COHEN N.D., MATEJKA P.L., HONNAS C.M., HOOPER R.N., TEXAS EQUINE COLIC STUDY GROUP. Case-control study of the association between various management factors and development of colic in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **206**, 667-673.

COOK B.H., WILSON Jr. E.R., TAYLOR A.E. Intestinal fluid loss in hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, 1971, **221**, G1494-1498.

CYBULSKY M.I., MCCOMB D.J., MOVAT H.Z. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. *J. Immunol.*, 1988, **140**, 3144-3149.

DA SILVA CORREIA J., SOLDAU K., CHRISTEN U., TOBIAS P.S., ULEVITCH R.J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 21129-21135.

DABAREINER R.M., SULLINS K.E., SNYDER J.R., WHITE N.A., GARDNER I.A. Evaluation of the microcirculation of the equine small intestine after intraluminal distention and subsequent decompression. *Am. J. Vet. Res.*, 1993a, **54**, 1673-1682.

DABAREINER R.M., WHITE N.A. Large colon impaction in horses: 147 cases (1985-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **206**, 679-685.

DART A.J., SNYDER J.R., PASCOE J.R., FARVER T.B., GALUPPO L.D. Abnormal conditions of the equine descending (small) colon: 102 cases (1979-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **200**, 971-978.

DART A.J., HODGSON D.R., SNYDER J.R. Caecal disease in equids. *Proc. Ann. Scient. Meet. Europ. Coll. Vet. Surg.*, 2000, **9**, 176-177.

DEBY C., GOUTIER R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem. Pharmacol.*, 1990, **39**, 399-405.

DEBY-DUPONT G., HAAS M., PINCEMAIL J., BRAUN M., LAMY M., DEBY C., FRANCHIMONT P. Immunoreactive trypsin in the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.*, 1984, **10**, 7-12.

DEBY-DUPONT G. Mise au point d'un dosage radio-immunologique et enzymatique de la trypsine humaine. Application aux états de choc (PhD Thesis). Université de Liège : Liège, 1987, 218 p.

DEBY-DUPONT G., REYNAERT M., LAMY M., FRANCHIMONT P. Justification biochimique du drainage du canal thoracique au cours de la pancréatite nécrotique hémorragique. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 1988, **L1**, 31-40.

DEBY-DUPONT G., CROISIER J.L., CAMUS G., BRUMIOUL D., MATHY-HARTERT M., SONDAG D., DEBY C., LAMY M. Inactivation of α 2-macroglobulin by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Mediators Inflamm.*, 1994, **3**, 117-123.

DEBY-DUPONT G., DEBY C., LAMY M. Espèces oxygénées activées et radicaux libres. In: Carlet J., Martin C., Offenstadt G. (Eds.), États infectieux graves - Perspectives thérapeutiques. Masson : Paris, 1995a, 130-148.

DEBY C., HARTSTEIN G., DEBY-DUPONT G., LAMY M. Antioxidant therapy. In: Bion J.F. (Ed.), Current topics in intensive care 2. W.D. Saunders Company Ltd : London, 1995b, 175-205.

DEBY-DUPONT G., DEBY C., LAMY M. Oxygen therapy in intensive care patients: a vital poison? In: Vincent J.L. (Ed.), Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. Springer Verlag : Berlin, 1999, 417-432.

DI MASCIO P., BRIVIBA K., BECHARA E.J., MEDEIROS M.H., SIES H. Reaction of peroxynitrite and hydrogen peroxide to produce singlet molecular oxygen (Δ). *Methods Enzymol.*, 1996, **269**, 395-400.

DRAZEN J.M., AUSTEN K.F., LEWIS R.A., CLARK D.A., GOTO G., MARFAT A., COREY E.J. Comparative airway and vascular activities of leukotriènes C-1 and D in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 4354-4358.

DUCHARME N.G., HACKETT R.P., DUCHARME G.R., LONG S. Surgical treatment of colic. Results in 181 horses. *Vet. Surg.*, 1983, **12**, 206-209.

DUCHARME N.G., PASCOE P.J., LUMSDEN J.H., DUCHARME G.R. A computer-derived protocol to aid in selecting medical versus surgical treatment of horses with abdominal pain. *Equine Vet. J.*, 1989, **21**, 447-450.

DUCHARME N.G., FREEMAN D.E., STECKEL R.R., DEAN P.W., YOUNG D.R. Principles of intestinal surgery. In : Auer J.A. (Ed.), Equine Surgery, W.B. Saunders Company : Philadelphia, 1992, 331-333.

DYSON S. Review of 30 cases of peritonitis in the horse. *Equine Vet. J.*, 1983, **15**, 25-30.

EBERT R. Letalitätsaspekte der Kolik des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 1994a, **10**, 89-93.

EBERT R. Prognostische Parameter bei der Kolik des Pferdes. *Tierärztl. Prax.*, 1994b, **22**, 256-263.

EBERT R. Differenzierte Prognostik beim Kolikpferd. *Tierärztl. Prax.*, 1995, **23**, 475-480.

EISERICH J.P., HRISTOVA M., CROSS C.E., JONES A.D., FREEMAN B.A., HALLIWELL B., VAN DER VLIET A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myéloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 1998, **391**, 393-397.

EL-HAG A., CLARK R.A. Immunosuppression by activated human neutrophils. *J. Immunol.*, 1987, **139**, 2406-2413.

ELLIS H. The clinical significance of adhesions : focus on intestinal obstruction. *Eur. J. Surg.*, 1997, **577** : Suppl, 5-9.

EMBERTSON R.M., COLAHAN P.T., BROWN M.P., PEYTON L.C., SCHNEIDER R.K., GRANSTEDT M.E. Ileal impaction in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1985, **186**, 570-572.

ENGELBERT T.A., TATE L.P., BOWMAN K.F., BRISTOL D.G. Incarceration of the small intestine in the epiploic foramen. Report of 19 cases (1983-1992). *Vet. Surg.*, 1993, **22**, 57-61.

ENGLER R.L., DAHLGREN M.D., PETERSON M.A., DOBBS A., SCHMID-SCHÖNBEIN G.W. Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental myocardial ischemia. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 1986, **251**, H93-H100.

FAYMONVILLE M.E., PINCEMAIL J., DUCHATEAU J., PAULUS J.M., ADAM A., DEBY-DUPONT G., DEBY C., ALBERT A., LARBUISSON R., LIMET R., LAMY M. Myeloperoxidase and elastase as markers of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1991, **102**, 309-317.

FENNA R., ZENG J., DAVEY C. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **316**, 653-656.

FERNANDEZ-DEL CASTILLO C., HARRINGER W., WARSHAW A.L., VLAHAKES G.J., KOSKI G., ZASLAVSKY A.M., RATTNER D.W. Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *N. Engl. J. Med.*, 1991, **325**, 382-387.

FESSLER J.F., BOTTOMS G.D., COPPOC G.L., GIMARC S., LATSHAW H.S., NOBLE J.K. Plasma endotoxin concentrations in experimental and clinical equine subjects. *Equine Vet. J.*, 1989, **7**: Suppl, 24-28.

FIORENTINO D.F., ZLOTNIK A., MOSMANN T.R., HOWARD M., O'GARRA A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*, 1991, **147**, 3815-3822.

FLORHOLMEN J., REVHAUG A., BURHOL P.G., GIERCKSKY K.E., OLSEN R. Effect of intravenous and intraduodenal administration of *Escherichia coli* endotoxin on the porcine pancreas as evaluated by changes in the serum cationic trypsin-like immunoreactivity. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1985a, **20**, 279-284.

FLORHOLMEN J., REVHAUG A., BURHOL P.G., LUNDGREN T.I., GIERCKSKY K.E. Effect of hemorrhagic and nortriptyline-induced shock on the porcine pancreas as evaluated by changes in serum cationic trypsin-like immunoreactivity. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1985b, **20**, 720-726.

FOERNER J.J., RINGLE M.J., JUNKINS D.S., FISCHER A.T., MACHARG M.A., PHILLIPS T.N. Transsection of the pelvic flexure to reduce incarceration of the large colon through the epiploic foramen in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **203**, 1312-1313.

FONTAINE G.L., BELKNAP J.K., ALLEN D., MOORE J.N., KROLL D.L. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 714-720.

FORD-HUTCHINSON A.W., BRAY M.A., DOIG M.V., SHIPLEY M.E., SMITH M.J. Leukotriène B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, 1980, **286**, 264-265.

FREDEN G.O., PROVOST P.J., RAND W.M. Reliability of using results of abdominal fluid analysis to determine treatment and predict lesion type and outcome for horses with colic : 218 cases (1991-1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 1012-1015.

FREEMAN D.E., HAMMOCK P., BAKER G.J., GOETZ T., FOREMAN J.H., SCHAEFFER D.J., RICHTER R.A., INOUE O., MAGID J.H. Short- and long-term survival and prevalence of postoperative ileus after small intestinal surgery in the horse. *Equine Vet. J.*, 2000, **32** : Suppl, 42-51.

FRENCH K., POLLITT C.C., PASS M.A. Pharmacokinetics and metabolic effects of triamcinolone acetonide and their possible relationships to glucocorticoid-induced laminitis in horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2000, **23**, 287-292.

FRIDOVICH I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978, **201**, 875-880.

FRITZ H. Human mucus proteinase inhibitor (human MPI). Human seminal inhibitor I (HUSI-I), antileukoprotease (ALP), secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI). *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 1988, **369** : Suppl, 79-82.

FUJISHIMA S., AIKAWA N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med.*, 1995, **21**, 277-285.

FURR M.O., LESSARD P., WHITE N.A. Development of a colic severity score for predicting the outcome of equine colic. *Vet. Surg.*, 1995, **24**, 97-101.

GAMBLE J.R., HARLAN J.M., KLEBANOFF S.J., VADAS M.A. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 8667-8671.

GAUGHAN E.M., HACKETT R.P. Cecocolic intussusception in horses: 11 cases (1979-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1990, **197**, 1373-1375.

GAY C.C., CARTER J., McCARTHY M., MASON T.A., CHRISTIE B.A., REYNOLDS W.T., SMYTH B. The value of arterial blood pressure measurement in assessing the prognosis in equine colic. *Equine Vet. J.*, 1977, **9**, 202-204.

GAYLE J.M., BLIKSLAGER A.T., BOWMAN K.F. Mesenteric rents as a source of small intestinal strangulation obstruction in horses: 15 cases (1990-1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2000, **216**, 1446-1449.

GAYLE J.M., MACHARG M.A., SMALLWOOD J.E. Strangulating obstruction caused by intestinal herniation through the proximal aspect of the cecocolic fold in 9 horses. *Vet. Surg.*, 2001, **30**, 40-43.

GEGNER J.A., ULEVITCH R.J., TOBIAS P.S. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 5320-5325.

GERARD M.P., BOWMAN K.F., BLIKSLAGER A.T., TATE L.P., BRISTOL D.G. Jejunocolostomy or ileocolostomy for treatment of cecal impaction in horses: nine cases (1985-1995). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **209**, 1287-1290.

GERRING E.L., KING J.N., EDWARDS G.B., PEARSON H., WALMSLEY J.P., GREET T.R.C. A multicentre trial of cisapride in the prophylaxis of equine post operative ileus. *Equine Vet. Educ.*, 1991, **3**, 143-145.

GERRING E.L. Factors affecting gut motility. *Equine Vet. Educ.*, 1991, **3**, 146-148.

GHAFOURIFAR P., RICHTER C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.*, 1997, **418**, 291-296.

GIBSON K.T., CURTIS C.R., TURNER A.S., McILWRAITH C.W., AANES W.A., STASHAK T.S. Incisional hernias in the horse. Incidence and predisposing factors. *Vet. Surg.*, 1989, **18**, 360-366.

GIULIVI C., PODEROSO J.J., BOVERIS A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 11038-11043.

GLUNTZ X. Affections de l'intestin grêle entraînant des coliques chez le cheval adulte. *Prat. Vét. Equine*, 1999, **31**, 302-312.

GLUNTZ X., BATTAIL G.A., JACOT S. Hernie inguinale chez le cheval adulte: étude de 29 cas (1993-1997). *Prat. Vét. Equine*, 1998, **30**, 33-43.

GOODRICH L.R., DABAREINER R.M., WHITE N.A.II. Entrapment of the small intestine within the nephrosplenic space in two horses. *Equine Vet. Educ.*, 1997, **9**, 177-179.

GOW A.J., CHEN Q., GOLE M., THEMISTOCLEOUS M., LEE V.M., ISCHIROPOULOS H. Two distinct mechanisms of nitric oxide-mediated neuronal cell death show thiol dependency. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*, 2000, **278**, C1099-C1107.

GRANGER D.N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 1988, **255**, H1269-H1275.

GRIENDLING K.K., SORESCU D., USHIO-FUKAI M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 2000, **86**, 494-501.

GRISHAM M.B., HERNANDEZ L.A., GRANGER D.N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, 1986, **251**, G567-G574.

GRISHAM M.B., GRANGER D.N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig. Dis. Sci.*, 1988, **33** : Suppl Mars, 6S-15S.

GRISHAM M.B., JOURD'HEUIL D., WINK D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites : implications in inflammation. *Am. J. Physiol.*, 1999, **276**, G315-G321.

GUTHRIE L.A., McPHAIL L.C., HENSON P.M., JOHNSTON R.B.Jr. Priming of neutrophils for enhanced by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J. Exp. Med.*, 1984, **160**, 1656-1671.

HACKETT R.P. Nonstrangulated colonic displacement in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1983, **182**, 235-240.

HAGLUND U., LUNDGREN O. Reactions within the consecutive vascular sections of the small intestine of the cat during prolonged hypotension. *Acta Physiol. Scand.*, 1972, **84**, 151-163.

HAGLUND U., HULTEN L., AHREN C., LUNDGREN O. Mucosal lesions in the human small intestine in shock. *Gut*, 1975, **16**, 979-984.

HAGUE B.A., HONNAS C.M., BERRIDGE B.R., EASTER J.L. Evaluation of postoperative peritoneal lavage in standing horses for prevention of experimentally induced abdominal adhesions. *Vet. Surg.*, 1998, **27**, 122-126.

HANSON R.R., NIXON A.J., CALDERWOOD-MAYS M., GRONWALL R. Evaluation of three techniques for end-to-end anastomosis of the small colon in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1988a, **49**, 1613-1620.

HANSON R.R., NIXON A.J., CALDERWOOD-MAYS M., GRONWALL R., PENDERGAST J.F. Comparison of staple and suture techniques for end-to-end anastomosis of the small colon in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1988b, **49**, 1621-1628.

HANSON R.R., NIXON A.J., GRONWALL R., MEYER D., PENDERGAST J. Evaluation of peritoneal fluid following intestinal resection and anastomosis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 216-221.

HANSON R.R., WRIGHT J.C., SCHUMACHER J., BAIRD A.N., HUMBURG J., PUGH D.G. Surgical reduction of ileal impactions in the horse: 28 cases. *Vet. Surg.*, 1998, **27**, 555-560.

HARDY J., BERTONE A.L. Surgery of the equine large colon. *Comp. Cont. Educ. Equine*, 1992, **14**, 1501-1506.

HARRIS R.J., SYNOW L., BROWSTON N.M. Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Met.*, 1981, **1**, 203-209.

HARRISON I.W. Equine large intestinal volvulus. A review of 124 cases. *Vet. Surg.*, 1988, **17**, 77 – 81.

HARPEL P.C., MOESSON N.W. Degradation of fibrinogen by plasma α 2-macroglobulin enzyme complexes. *J. Clin. Invest.*, 1973, **53**, 2175-2184.

HARTWIG W., WERNER J., JIMENEZ R.E., Z'GRAGGEN K., WEIMANN J., LEWANDROWSKI K.B., WARSHAW A.L., FERNANDEZ-DEL CASTILLO C. Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute pancreatitis-associated lung injury. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, 1999, **277**, G1008–G1016.

HARTWIG W., JIMENEZ R.E., FERNANDEZ-DEL CASTILLO C., KELLIHER A., JONES R., WARSHAW A.L. Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Ann. Surg.*, 2001, **233**, 371-378.

HASLETT C., GUTHRIE L.A., KOPANIAK M.M., JOHNSTON R.B. Jr., HENSON P.M. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Pathol.*, 1985, **119**, 101-110.

HASSEL D.M., LANGER D.L., SNYDER J.R., DRAKE C.M., GOODELL M.L., WYLE A. Evaluation of enterolithiasis in equids: 900 cases (1973-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1999, **214**, 233-237.

HAWKINS D.L., MACKAY R.J., MACKAY S.L., MOLDAWER L.L. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediators by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **66**, 1-10.

HAY W.P., MUELLER P.O., HARMON B., AMOROSO L. One percent sodium carboxymethylcellulose prevents experimentally induced abdominal adhesions in horses. *Vet. Surg.*, 2001, **30**, 223-227.

HAZEN S.L., HSU F.F., D'AVIGNON A., HEINECKE J.W. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry*, 1998, **37**, 6864-6873.

HENRICKS P.A., VAN DER TOL M.E., THYSSEN R.M., VAN ASBECK B.S., VERHOEF J. Escherichia coli lipopolysaccharides diminish and enhance cell function of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 1983, **15**, 294-301.

HERNANDEZ L.A., GRISHAM M.B., TWOHIG B., ARFORS K.E., HARLAN J.M., GRANGER D.N. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 1987, **253**, H699-H703.

HESSE D.G., TRACEY K.J., FONG Y., MANOGUE K.R., PALLADINO M.A.Jr., CERAMI A., SHIRES G.T., LOWRY S.F. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1988, **166**, 147-153.

HILTEBRAND L.B., KREJCI V., BANIC A., ERNI D., WHEATLEY A.M., SIGURDSSON G.H. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Crit. Care Med.*, 2000, **28**, 3233-3241.

HOFMEISTER S., BECKER M., BÖCKENHOFF G. Beitrag zur Behandlung der Verlagerung des Colon ascendens in den Milz-Nieren-Raum. *Tierärztl. Prax.*, 1998, **26**, 85-93.

HOLMDAHL L., RISBERG B., BECK D.E., BURNS J.W., CHEGINI N., DIZEREGA G.S., ELLIS H. Adhesions: pathogenesis and prevention – panel discussion and summary. *Eur. J. Surg.*, 1997, **577** : Suppl, 56-62.

HUBER T.S., GAINES G.C., WELBORN M.B.^{3rd}, ROSENBERG J.J., SEEGER J.M. MOLDAWER L.L. Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: Il-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock*, 2000, **13**, 425-434.

HUGHES F.E., SLONE D.E. Large colon resection. *Vet. Clin. North Am. Equine pract.*, 1997, **13**, 341-350.

HUGHES F.E., SLONE D.E. A modified technique for extensive large colon resection and anastomosis in horses. *Vet. Surg.*, 1998, **27**, 127-131.

HUNT J.M., EDWARDS G.B., CLARKE K.W. Incidence, diagnosis and treatment of postoperative complications in colic cases. *Equine Vet. J.*, 1986, **18**, 264-270.

HUSKAMP B. Ileusdiagnose beim Pferd. *Tierärztl. Prax.*, 1973, **1**, 67-74.

HUSKAMP B. The diagnosis and treatment of acute abdominal conditions in the horse: The various types and frequency as seen at the animal hospital in Hochmoor. *Proc. Int. Symp. Colic Res. Univ. Georgia, USA.*, 1982, **1**, 261-272.

HUSKAMP B., KOPF N. Right dorsal displacement of the large colon in the horse. *Equine Pract.*, 1983, **5**, 20-29.

ISCHIROPOULOS H. Biological tyrosine nitration : a physiopathological function of nitric oxide and reactive oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **356**, 1-11.

JIN F.Y., NATHAN C., RADZIOCH D., DING A. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell*, 1997, **88**, 417-426.

JOHNSON P.J., KREEGER J.M., KEELER M., GANJAM V.K., MESSER N.T. Serum markers of lamellar basement membrane degradation and lamellar histopathological changes in horses affected with laminitis. *Equine Vet. J.*, 2000, **32**, 462-468.

JOHNSTON G.M. Equine anaesthesia – a chance to cut is a chance to kill. *Proc. Assoc. Vet. Anaesth.*, 2000, 1-2.

JOHNSTONE I.B., CRANE S. Hemostatic abnormalities in equine colic. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 356-358.

KAMATA H., HIRATA H. Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signaling*, 1999, **11**, 1-14.

KARIMOVA A., PINSKY D.J. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med.*, 2001, **27**, 19-31.

KARNOFSKY J.R., WRIGHT J., MILES-RICHARDSON G.E., TAUBER A. Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *J. Clin. Invest.*, 1984, **74**, 1489-1495.

KATWA L.C., JOHNSON P.J., GANJAM V.K., KREEGER J.M., MESSER N.T. Expression of endothelin in equine laminitis. *Equine Vet. J.*, 1999, **31**, 243-247.

KELLER S.D., HORNEY F.D. Diseases of the equine small colon. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 1985, **7**, 113-120.

KERSJES A.W., BRAS G.E., NEMETH F., VAN DER VELDEN M.A., FIRTH E.C. Results of operative treatment of equine colic with special reference to surgery of the ileum. *Vet. Quart.*, 1988, **10**, 17-25.

KETTELHUT I.C., FIERS W., GOLDBERG A.L. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84**, 4273-4277.

KETTLE A.J., GEDYE C.A., WINTERBOURN C.C. Superoxide is an antagonist of anti-inflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by myeloperoxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 1993, **45**, 2003-2010.

KHAN A.U. Quantitative generation of singlet (1 delta g) oxygen from acidified aqueous peroxynitrite produced by the reaction of nitric oxide and superoxide anion. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1995, **10**, 329-33.

KING C.C., JEFFERSON M.M., THOMAS E.L. Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1997, **61**, 293-302.

KING J.N., GERRING E.L. Detection of endotoxin in cases of equine colic. *Vet. Rec.*, 1988, **123**, 269-271.

KING J.N., GERRING E.L. The action of low dose endotoxin on equine bowel motility. *Equine Vet. J.*, 1991, **23**, 11-17.

KISSNER R., NAUSER T., BUGNON P., LYE P.G., KOPPENOL W.H. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high pressure stopped flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 1285-1292.

KLEBANOFF S.J., CLARK R.A. Hemolysis and iodination of erythrocyte components by a myeloperoxidase-mediated system. *Blood*, 1975, **45**, 699-707.

KLEBANOFF S.J. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 1999, **111**, 383-389.

KLOHNEN A., VACHON A.M., FISCHER A.T. Jr. Use of diagnostic ultrasonography in horses with signs of acute abdominal pain. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **209**, 1597-1601.

KNOELL D.L., RALSTON D.R., COULTER K.R., WEWERS M.D. Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α in monocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998, **157**, 246-255.

KOBLUK C.N., DUCHARME N.G., LUMSDEN J.H., PASCOE P.J., LIVESEY M.A., HURTIG M., HORNEY F.D., ARIGHI M. Factors affecting incisional complication rates associated with colic surgery in horses: 78 cases (1983-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **195**, 639-642.

KOENIG J.B., COTE N., LA MARRE J. Binding of porcine motilin and erythromycin lactobionate in the equine gastrointestinal tract. *Proc. Ann. Scientif. Meet. Europ. Coll. Vet. Surg.*, 2001, **10**, 222-223.

KOOP H. Serum levels of pancreatic enzymes and their clinical significance. *Clin. Gastroenterol.*, 1984, **13**, 739-761.

KOOTER I.M., MOGUILVSKY N., BOLLEN A., VAN DER VEEN L.A., OTTO C., DEKK H.L., WEVER R. The sulfonium linkage in myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 26794-26802.

KOPF N., HUSKAMP B. Die rektale Untersuchung beim Kolikpferd. *Prakt. Tierarzt*, 1978, **4**, 259-268.

KOWALTOWSKI A.J., CASTILHO R.F., VERCESI A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling of inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.*, 1996, **378**, 150-152.

KUBES P., IBBOTSON G., RUSSELL J., WALLACE J.L., GRANGER D.N. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocytes adherence. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, 1990, **259**, G300-G305.

KUBES P., HUNTER J., GRANGER D.N. Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. *Gastroenterol.*, 1992, **103**, 807-812.

KUEBELBECK K.L., SLONE D.E., MAY K.A. Effect of omentectomy on adhesion formation in horses. *Vet. Surg.*, 1998, **27**, 132-137.

LAFARS G., LANTOINE F., DEVYNCK M.A., PALMBLAD J., GYLLENHAMMAR H. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B₄, C₄, and D₄ in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 1999, **93**, 1399-1405.

LAMARRE J., WOLLENBERG G.K., GONIAS S.L., HAYES M.A. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha 2-macroglobulins. *Lab. Invest.*, 1991, **65**, 3-14.

LAMY M., FAYMONVILLE M.E., DEBY-DUPONT G. Shock pancreas : A new entity? In: Vincent J.L. (Ed.), Update in intensive care and emergency medicine. Springer Verlag : Berlin, 1987, 148-154.

LANGER F., MORYS-WORTMANN C., KUSTERS B., STORCK J. Endothelial protease-activated receptor-2 induces tissue factor expression and von Willebrand factor release. *Br. J. Haematol.*, 1999, **105**, 542-550.

LASSON A., OHLSSON K. An in vitro study of the influence of plasma protease inhibitors and aprotinin on trypsin-induced C3 cleavage in human serum. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **709**, 227-233.

LEFER A.M., BARENHOLZ Y. Pancreatic hydrolases and the formation of a myocardial depressant factor in shock. *Am. J. Physiol.*, 1972, **223**, 1103-1109.

LEFF A.R. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annu. Rev. Med.*, 2001, **52**, 1-14.

LEFKOWITZ D.L., MILLS K., MORGAN M., LEFKOWITZ S. Macrophage activation and immuno-modulation by myeloperoxidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1992, **199**, 204-210.

LEHNINGER A.L., NELSON D.L., COX M.M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. (Eds.), *Principles of biochemistry*, Worth Publishers: New York, 1993, 542-571.

LELLI J.L. Jr., BECKS L.L., DABROWSKA M.I., HINSHAW D.B. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, **25**, 694-702.

LUNDBERG A.H., EUBANKS J.W.^{3rd}, HENRY J., SABEK O., KOTB M., GABER L., NORBY-TEGLUND A., GABER A.O. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas*, 2000, **21**, 41-51.

LUNDIN C., SULLINS K.E., WHITE N.A., CLEM M.F., DEBOWES R.M., PFEIFFER C.A. Induction of peritoneal adhesions with small intestinal ischaemia and distension in the foal. *Equine Vet. J.*, 1989, **21**, 451-458.

MAIER R.V., ULEVITCH R.J. The response of isolated rabbit hepatic macrophages (H-M macrophage) to lipopolysaccharide (LPS). *Circ. Shock*, 1981, **8**, 165-181.

MAIR T.S., HILLYER M.H., TAYLOR F.G.R. Peritonitis in adult horses: A review of 21 cases. *Vet. Rec.*, 1990, **126**, 567-570.

MARTIN B.B., FREEMAN D.E., ROSS M.W., RICHARDSON D.W., JOHNSTON J.K., ORSINI J.A. Cecocolic and cecocecal intussusception in horses: 30 cases (1976-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1999, **214**, 80-84.

MATHY-HARTERT M., DEBY-DUPONT G., DEBY C., JADOUL L., VANDENBERGHE A., LAMY M. Cytotoxicity induced by neutrophil myeloperoxidase towards human endothelial cells: protection by ceftazidime. *Mediators Inflamm.*, 1995, **4**, 1-7.

MATHY-HARTERT M., DEBY-DUPONT G., MELIN P., LAMY M., DEBY C. Bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* is acquired by cultured human monocyte-derived macrophages after uptake of myeloperoxidase. *Experientia*, 1996, **52**, 167-174.

MATHY-HARTERT M., DAMAS P., NYS M., DEBY-DUPONT G., CANNIVET J.L., LEDOUX D., LAMY M. Nitrated proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia. *Eur. Respir. J.*, 2000, **16**, 296-301.

MCCARTHY R.N., HUTCHINS D.R. Survival rates and post-operative complications after equine colic surgery. *Austr. Vet. J.*, 1988, **65**, 40-43.

MCCLURE J.J., MCCLURE J.R., JOHNSON D.W. Detection of endotoxin in the blood and peritoneal fluid of ponies with experimentally created strangulation obstruction of the small intestine. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Equine Pract.*, 1982, **1**, 102-108.

MCCORD J.M., FRIDOVICH I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 5753-5760.

MCCORD J.M. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.*, 1987, **46**, 2402-2406.

MCDONALD M.H., PASCOE J.R., STOVER S.M., MEAGHER D.M. Survival after small intestine resection and anastomosis in horses. *Vet. Surg.*, 1989, **18**, 415-423.

MCEVER R.P. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1992, **4**, 840-849.

MCILWRAITH C.W. Complications of laparotomy incisions in the horse. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Equine Pract.*, 1978, **24**, 209-218.

MCILWRAITH C.W., TURNER A.S. Jejunocecal anastomosis. In : McILWRAITH C.W., TURNER A.S. (Eds.), *Equine surgery. Advanced techniques*. Lea & Febiger : Philadelphia, 1987, 309-314.

MEE A.M., CRIPPS P.J., JONES R.S. A retrospective study of mortality associated with general anaesthesia in horses: elective procedures. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 275-276.

MEE A.M., CRIPPS P.J., JONES R.S. A retrospective study of mortality associated with general anaesthesia in horses: emergency procedures. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 307-309.

MENZIES D., ELLIS H. Intra-abdominal adhesions and their prevention by topical tissue plasminogen activator. *J. R. Soc. Med.*, 1989, **82**, 534-535.

MESCHTER C.L., CRAIG D., HACKETT R. Histopathological and ultrastructural changes in simulated large colonic torsion and reperfusion in ponies. *Equine Vet. J.*, 1991, **23**, 426-433.

MEYER H. Einfluss der Ernährung auf die Entstehung von Koliken (Verdauungsstörungen) beim Pferd. *Tierärztl. Prax.*, 1991, **19**, 515-520.

MIOSSEC P., CAVENDER D., ZIFF M. Production of interleukin-1 by human endothelial cells. *J. Immunol.*, 1986, **136**, 2486-2491.

MOLL H.D., SCHUMACHER J., WRIGHT J.C., SPANO J.S. Evaluation of sodium carboxymethylcellulose for prevention of experimentally induced abdominal adhesions in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 88-90.

MONREAL L., ANGLAS A., ESPADA Y., MONASTERIO J., MONREAL M. Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet. J.*, 2000, **32** : Suppl, 19-25.

MOORE J.N., WHITE N.A., BERG J.N., TRIM C.M., GARNER H.E. Endotoxemia following experimental intestinal strangulation obstruction in ponies. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, **45**, 330-332.

MOORE K.L., ANDREOLI S.P., ESMON N.L., ESMON C.T., BANG N.U. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 1987, **79**, 124-130.

MOORE R.M., BERTONE A.L. Perioperative medical therapy for horses with intestinal ischemia. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 1992, **14**, 1514-1522.

MOORE R.M., BERTONE A.L., BAILEY M.Q., MUIR W.W., BEARD W.L. Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1454-1463.

MORRIS D.D. Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J. Vet. Int. Med.*, 1991, **5**, 167-181.

MORRIS D.D., MOORE J.N., CROWE N. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic attributable to gastrointestinal tract disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 1565-1569.

MUELLER P.O., HAY W.P., HARMON B., AMOROSO L. Evaluation of a bioresorbable hyaluronate-carboxymethylcellulose membrane for prevention of experimentally induced abdominal adhesions in horses. *Vet. Surg.*, 2000, **29**, 48-53.

MULLER KOBOLD A.C., TULLEKEN J.E., ZIJLSTRA J.G., SLUITER W., HERMANS J., KALLENBERG C.G., COHEN TERVAERT J.W. Leukocyte activation in sepsis; correlation with disease state and mortality. *Intensive Care Med.*, 2000, **26**, 883-892.

MULLIGAN M.S., DESROCHERS P.E., CHINNAIYAN A.M., GIBBS D.F., VARANI J., JOHNSON K.J., WEISS S.J. In vivo suppression of immune complex-induced alveolitis by secretory leukoprotease inhibitor and tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 11523-11527.

MULLIGAN M.S., LENTSCH A.B., HUBER-LANG M., GUO R.F., SARMA V., WRIGHT C.D., ULICH T.R., WARD P.A. Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor. *Am. J. Pathol.*, 2000, **156**, 1033-1039.

MUNGALL B.A., POLLITT C.C. Zymographic analysis of equine laminitis. *Histochem. Cell. Biol.*, 1999, **112**, 467-472.

MUNGALL B.A., KYAW-TANNER M., POLLITT C.C. In vitro evidence for a bacterial pathogenesis of equine laminitis. *Vet. Microbiol.*, 2001, **79**, 209-223.

MURRAY R.C., CONSTANTINESCU G.M., GREEN E.M. Equine enterolithiasis. *Comp. Cont. Educ. Equine*, 1992, **14**, 1104-1112.

NAUSEEF W.M., McCORMICK S., GOEDKEN M. Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase. *Redox Report*, 2000, **5**, 197-206.

NAWROTH P.P., STERN D.M. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 1986, **163**, 740-745.

NAWROTH P.P., BANK I., HANDLEY D., CASSIMERIS J., CHESS L., STERN D. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin-1. *J. Exp. Med.*, 1986, **163**, 1363-1375.

NELSON A.W. Analysis of equine peritoneal fluid. *Vet. Clin. North Am. (Large Anim. Pract.)*, 1979, **1**, 267-274.

NICOD L., LEUENBERGER P., SEYDOUX C., FEY F., VAN MELLE G., PERRET C. Evidence for pancreas injury in adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1985, **131**, 696-699.

NOVOTNY M.J., TURRENTINE M.A., JOHNSON G.S., ADAMS H.R. Experimental endotoxemia increases plasma von Willebrand factor antigen concentrations in dogs with and without free-radical scavenger therapy. *Circ. Shock*, 1987, **23**, 205-225.

OBERHOLZER A., OBERHOLZER C., MOLDAWER L.L. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit. Care Med.*, 2002, **30** : Suppl 1, S58-S63.

OHLSSON K., BJORK P., BERGENFELDT M., HAGEMAN R., THOMPSON R.C. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality form endotoxin shock. *Nature*, 1990, **348**, 550-552.

ORSINI J.A., ELSER A.H., GALLIGAN D.T., DONAWICK J.W., KRONFELD D.S. Prognostic index for acute abdominal crisis (colic) in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 1969-1971.

PARK P.O., HAGLUND U., BULKLEY G.B., FALT K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surg.*, 1990, **107**, 574-580.

PARKER J.E., FUBINI S.L., CAR B.D., ERB H.N. Prevention of intraabdominal adhesions in ponies by low-dose heparin therapy. *Vet. Surg.*, 1987, **16**, 459-462.

PARKER M.C., ELLIS H., MORAN B.J., THOMPSON J.N., WILSON M.S., MENZIES D., McGUIRE A., LOWER A.M., HAWTHORN R.J.S., O'BRIEN F., BUCHAN S., CROWE A.M. Postoperative Adhesions : Ten-year follow-up of 12584 patients undergoing lower abdominal surgery. *Dis. Col. Rect.*, 2001, **44**, 822-830.

PARKS D.A., BULKLEY G.B., GRANGER D.N., HAMILTON S.R., McCORD J.M. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterol.*, 1982, **82**, 9-15.

PARKS D.A., GRANGER D.N., BULKLEY G.B., SHAH A.K. Soybean trypsin inhibitor attenuates ischemic injury to the feline small intestine. *Gastroenterol.*, 1985, **89**, 6-12.

PARKS D.A., GRANGER D.N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, 1986, **250**, G749-G753.

PARRY B.W., ANDERSON G.A., GAY C.C. Prognosis in equine colic : A study of individual variables used in case assessment. *Equine Vet. J.*, 1983a, **15**, 337-344.

PARRY B.W., ANDERSON G.A., GAY C.C. Prognosis in equine colic : a comparative study of variables used to assess individual cases. *Equine Vet. J.*, 1983b, **15**, 211-215.

PASCOE P.J., McDONELL W.N., TRIM C.M., VAN GORDER J. Mortality rates and associated factors in equine colic operations – a retrospective study of 341 operations. *Can. Vet. J.*, 1983, **24**, 76-85.

PASCOE J.R., PETERSON P.R. Intestinal healing and methods of anastomosis. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, 1989, **5**, 309-331.

PASS M.A., POLLITT S., POLLITT C.C. Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: a trigger for laminitis? *Equine Vet. J.*, 1998, **26** : Suppl, 133-138.

PEARSON H., MESSERVY A., PINSENT P.J. Surgical treatment of abdominal disorders in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1971, **159**, 1344-1352.

PERLMUTTER D.H., MAY L.T., SEHGAL P.B. Interferon β 2/interleukin-6 modulates synthesis of alpha 1-antitrypsin in human mononuclear phagocytes and in human hepatoma cells. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84**, 138-144.

PHILLIPS T.J., WALMSLEY J.P. Retrospective analysis of the results of 151 exploratory laparotomies in horses with gastrointestinal disease. *Equine Vet. J.*, 1993, **25**, 427-431.

PINCEMAIL J., DEBY-DUPONT G., DEBY C., THIRION A., TORPIER G., FAYMONVILLE M.E., DAMAS P., TOMASSINI M., LAMY M., FRANCHIMONT P. Fast double antibody radioimmunoassay of human granulocyte myeloperoxidase and its application to plasma. *J. Immunol. Methods*, 1991, **137**, 181-191.

POLLITT C.C., PASS M.A., POLLITT S. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. *Equine Vet. J.*, 1998, **26** : Suppl, 119-124.

POLLITT C.C., DAVIES C.T. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. *Equine Vet. J.*, 1998, **26** : Suppl, 125-132.

POLLITT C.C., DARADKA M. Equine laminitis basement membrane pathology: loss of type IV collagen, type VII collagen and laminin immunostaining. *Equine Vet. J.*, 1998, **26** : Suppl, 139-144.

PRASSE K.W., TOPPER M.J., MOORE J.N., WELLES E.G. Analysis of hemostasis in horses with colic. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **203**, 685-693.

PRESCOTT S.M., ZIMMERMAN G.A., STAFFORINI D.M., MCINTYRE T.M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.*, 2000, **69**, 419-445.

PRYOR W.A., SQUADRITO G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.*, 1995, **268**, L699-L722.

PUGIN J., ULEVITCH R.J., TOBIAS P.S. Activation of endothelial cells by endotoxin: direct versus indirect pathways and the role of CD14. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1995a, **392**, 369-373.

PUGIN J., ULEVITCH R.J., TOBIAS P.S. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta mediate human endothelial cell activation in blood at low endotoxin concentrations. *J. Inflamm.*, 1995b, **45**, 49-55.

PUOTUNEN-REINERT A., HUSKAMP B. Möglichkeiten der Prognostik beim chirurgischen Kolikpferd : Untersuchung von 110 Fällen. *Pferdeheilkunde*, 1985, **1**, 123-129.

PUOTUNEN-REINERT A. Study of variables commonly used in examination of equine colic cases to assess prognostic value. *Equine Vet. J.*, 1986, **18**, 275-277.

QUIJANO C., ALVAREZ B., GATTI R.M., AUGUSTO O., RADI R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem. J.*, 1997, **322**, 167-173

RADI R., PELUFFO G., ALVAREEZ M.N., NAVILIAT M., CAYOTA A. Unraveling peroxynitrite formation in biological system. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 463-488.

RAKESTRAW P.C., SNYDER J.R., WOLINER M.J., SANDERS K.M., SHUTTLEWORTH W.R. Involvement of nitric oxide in inhibitory neuromuscular transmission in equine jejunum. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 1206-1213.

REEVES M.J., CURTIS C.R., SALMAN M.D., STASHAK T.S., REIF J.S. Development and validation of multivariable models to predict the need for surgery and prognosis in equine colic patients. *Act. Vet. Scand.*, 1988, **84** : Suppl, 329-332.

REEVES M.J., CURTIS C.R., SALMAN M.D., HILBERT B.J. Prognosis in equine colic patients using multivariable analysis. *Can. J. Vet. Res.*, 1989, **53**, 87-94.

REEVES M.J., CURTIS C.R., SALMAN M.D., STASHAK T.S., REIF J.S. Multivariable prediction model for the need for surgery in horses with colic. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 1903-1907.

- RINDERKNECHT H. Pancreatic secretory enzymes. In: Vay Liang W. Go, Dimagno E.P., Gardner J.D., Lebenthal E., Reber H.A., Scheele G.A. (Eds.), *The Pancreas Biology, Pathobiology and Disease*. Raven Press, Ltd. : New York, 1993, 219-251.
- ROMSON J.L., HOOK B.G., KUNKEL S.L., ABRAMS G.D., SCHORK A., LUCCHESI B.R. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 1983, **67**, 1016-1023.
- ROSS M.W., DONAWICK W.J., SELLERS A.F., LOWE J.E. Normal motility of the cecum and right ventral colon in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 1756-1762.
- ROSS M.W., HANSON R.R. Jr. Large intestine. In : Auer J.A. (Ed.), *Equine Surgery*. W.B. Saunders Company : Philadelphia, 1992, 379-407.
- ROY R.S., MCCORD J.M. Ischaemia-induced conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Fed. Proc.*, 1982, **41**, 767-772.
- RYTER S.W., TYRRELL R.M. Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) : a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, **24**, 1520-1534.
- SAMPSON J.B., YE Y., ROSEN H., BECKMAN J.S. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Archiv. Biochem. Biophys.*, 1998, **356**, 207-213
- SANTSCHI E.M., GRINDEM C.B., TATE L.P., CORBETT W.T. Peritoneal fluid analysis in ponies after abdominal surgery. *Vet. Surg.*, 1988, **17**, 6-9.
- SANTSCHI E.M., SLONE D.E., FRANK II W.M. Use of ultrasound in horses for diagnosis of left dorsal displacement of the large colon and monitoring its nonsurgical correction. *Vet. Surg.*, 1993, **22**, 281-284.
- SARAN M., BECK-SPEIER I., FELLERHOFF B., BAUER G. Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 482-490.
- SARIS N.E., ERIKSSON K.O. Mitochondrial dysfunction in ischaemia – reperfusion. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 1995, **39**, 171-176.
- SATAKE K., ROZMANITH J.S., APPERT H., HOWARD J.M. Hemodynamic change and bradykinin levels in plasma and lymph during experimental acute pancreatitis in dogs. *Ann. Surg.*, 1973, **178**, 659-662.
- SAWYER DT. *Oxygen Chemistry*. University Press : Oxford, 1991.
- SCHMID-SCHONBEIN G.W., KISTLER E.B., HUGLI T.E. Mechanisms for cell activation and its consequences for biorheology and microcirculation: Multi-organ failure in shock. *Biorheology*, 2001, **38**, 185-201.

SCHNEIDER R.K., MILNE D.W., KOHN C.W. Acquired inguinal hernia in the horse: A review of 27 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1982, **180**, 317-320.

SCHNEIDER R.K., MEYER D.J., EMBERTSON R.M., GENTILE D.G., BUERGELT C.D. Response of pony peritoneum to four peritoneal lavage solutions. *Am. J. Vet., Res.*, 1988, **49**, 889-894.

SCHOONBROODT S., LEGRAND-POELS S., BEST-BELPOMME M., PIETTE J. Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, **321**, 777-785.

SCHRAMME M., BUTSON R. Abdominal adhesions – have we made any progress? *Equine Vet. J.*, 1997, **29**, 252-254.

SCHUSSER G.E., WHITE N.A. Morphologic and quantitative evaluation of the myenteric plexuses and neurons in the large colon of horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **210**, 928-934.

SCHWARTZ M.D., MOORE E.E., MOORE F.A., SHENKAR R., MOINE P., HAENEL J.B., ABRAHAM E. Nuclear factor- κ B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.*, 1996, **24**, 1285-1292.

SERTEYN D., CAUDRON I., SZOKE M., FONTAINE G., STACQUEZ S., CHEVE D. Diagnostic et pronostic des pathologies intestinales aiguës chirurgicales du cheval. *Prat. Vét. Equine*, 1994, **26**, **2**, 135-145.

SERTEYN D., PINCEMAIL J., MOTTART E., CAUDRON I., DEBY C., DEBY-DUPONT G., PHILLIPART C., LAMY M. Approche directe pour la mise en évidence des phénomènes radicalaires lors de myopathie postanesthésique équine : étude préliminaire. *Can. J. Vet. Res.*, 1994, **58**, 309-312.

SERTEYN D., BENBAREK H., DEBY-DUPONT G., GRULKE S., CAUDRON I., LAMY M. Effects of acepromazine on equine polymorphonuclear neutrophil activation. *Proc. 6th Int. Congr. Vet. Anest. (Grèce)*, 1997, **9**, 152.

SERTEYN D., BENBAREK H., DEBY-DUPONT G., GRULKE S., CAUDRON I., DEBY C., LAMY M. Effects of acepromazine on equine polymorphonuclear neutrophil activation : a chemiluminescence study. *Vet. J.*, 1999, **157**, 332-335.

SHERMAN K. Torsion and displacement of the large colon. *J. Equine Vet. Sci.*, 1996, **16**, 237-239.

SHIELDS R. The absorption and secretion of fluid and electrolytes by the obstructed bowel. *Br. J. Surg.*, 1965, **52**, 774-779.

SNYDER J.R., OLANDER H.J., PASCOE R.J., HOLLAND M., KURPERSHOEK C.J. Morphologic alterations observed during experimental ischemia of the equine large colon. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 801-809.

SNYDER J.R. The pathophysiology of intestinal damage: effects of luminal distention and ischemia. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1989, **5**, 247-270.

SNYDER J.R., PASCOE J.R., OLANDER H.J., SPIER S.J., MEAGHER D.M., BLEIFER D.R. Strangulating volvulus of the ascending colon in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **195**, 757-764.

SNYDER J.R., PASCOE J.R., OLANDER H.J., HINDS D.M., YOUNG R., TYLER W.S. Vascular injury associated with naturally occurring strangulating obstructions of the equine large colon. *Vet. Surg.*, 1990, **19**, 446-455.

SNYDER J.R., PASCOE J.R., OLANDER H.J., HARMON F.A., HINDS D.M., VATISTASA N.J., TYLER W.S. Ultrastructural mucosal injury after experimental ischemia of the ascending colon in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 1917-1924.

SNYDER J.R., VAN HOOGMOED L. Postoperative care, prevention, and treatment of ileus. *Proc. Ann. Scientif. Meet. Europ. Coll. Vet. Surg.*, 2000, **9**, 157-160.

SPRENGER E.D., KLUFT C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, 1987, **69**, 381-387.

STEENHOUT M.S., VANDENREYDT I., VAN ROY M. Incarceration of the large colon through the epiploic foramen in a horse. *Equine Vet. J.*, 1993, **25**, 550-551.

STOCKLEY R.A. Neutrophils and protease/antiprotéase imbalance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, S49-S52.

SUQUET C.M., LEID R.W. Aggregation of equine platelets by PAF (platelet activating factor). *Inflammation*, 1983, **7**, 197-203.

SUTER P.M., SUTER S., GIRARDIN E., ROUX-LOMBARD P., GRAU G.E., DAYER J.M. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, **145**, 1016-1022.

SWABB E.A., HYNES R.A., DONOWITZ M. Elevated intraluminal pressure alters rabbit small intestinal transport in vivo. *Am. J. Physiol.*, 1982a, **242**, G58-G64.

SWABB E.A., HYNES R.A., MARNANE W.G., MCNEIL J.S., DECKER R.A., TAI Y.H., DONOWITZ M. Intestinal filtration-secretion due to increased intraluminal pressure in rabbits. *Am. J. Physiol.*, 1982b, **242**, G65-G75.

TAUROG A., DORRIS M.L. Myeloperoxidase-catalysed iodination and coupling. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **296**, 239-246.

TENNANT B., WHEAT J.D., MEAGHER D.M. Observations on the causes and incidence of acute intestinal obstruction in the horse. *Proc. 18th Ann. Conv. Am. Ass. Equine Pract.*, 1972, **18**, 251-252.

THOEFNER M.B., ERSBØLL A.K., HESSELHOLT M. Prognostic indicators in a Danish hospital-based population of colic horses. *Equine Vet. J.*, 2000, **32** : Suppl, 11-18.

THOM S.R., XU Y.A., ISCHIROPOULOS H. Vascular endothelial cells generate peroxynitrite in response to carbon monoxide exposure. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 1023-1031.

TOBLER A., KOEFFLER H.P. Myeloperoxidase: localization, structure, and function. In: Harris G.R. (Éd.), Blood cell biochemistry. 3. Lymphocytes and granulocytes. Plenum Press : New York, 1991, 255-288.

TRACEY K.J., BEUTLER B., LOWRY S.F., MERRYWEATHER J., WOLPE S., MILSARK I.W., HARIRI R.J., FAHEY T.J. 3rd, ZENTELLA A., ALBERT J.D., SHIRES G.T., CERAMI A. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 1986, **234**, 470-474.

TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F., CERAMI A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, 1987, **330**, 662-664.

TRIM C.M., ADAMS J.G., COWGILL L.M., WARD S.L. A retrospective survey of anaesthesia in horses with colic. *Equine Vet. J.*, 1989, **7**: Suppl, 84-90.

TURNER T.A., ADAMS S.B., WHITE N.A. Small intestine incarceration through the epiploic foramen of the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1984, **184**, 731-734.

ULEVITCH R.J., TOBIAS P.S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, **13**, 437-457.

ULEVITCH R.J. Toll gates for pathogen selection. *Nature*, 1999, **401**, 755-756.

VACHON A.M., FISCHER A.T. Small intestinal herniation through the epiploic foramen: 53 cases (1987-1993). *Equine Vet. J.*, 1995, **27**, 373-380.

VALDEZ H., SCRUTCHFIELD W.L., TAYLOR T.S. Peritoneal lavage in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1979, **175**, 388-391.

VALDEZ L.B., ALVAREZ S., ARNAIZ S.L., SCHÖPFER F., CARRERAS M.C., PODEROSO J.J., BOVERIS A. Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **29**, 349-356.

VALLET B., WIEL E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit. Care Med.*, 2001, **29**: Suppl 7, S36-S41.

VAN DER VLIET A., CROSS C.E. Oxidants, nitrosants and the lung. *Am. J. Med.*, 2000, **109**, 398-421.

VAN DER VLIET A., EISERICH J.P., CROSS C.E. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir. Res.*, 2000, **1**, 67-72.

VAN HOOGMOED L.M., SNYDER J.R. Adjunctive methods in equine gastrointestinal surgery. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1997, **13**, 221-242.

VAN HOOGMOED L. Regulation and modulation of gastrointestinal motility with clinical application in horses. *Proc. Ann. Scientif. Meet. Europ. Coll. Vet. Surg.*, 2000, **9**, 138-143.

VAN HOOGMOED L.M., SNYDER J.R., NIETO J.G., HARMON F.A., TIMMERMAN B.L. Effect of a leukocyte-depleting filter in an extracorporeal circuit used for low-flow ischemia and reperfusion of equine jejunum. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 87-96.

VAN WESTREENEN M., VAN DEN TOL P.M., PRONK A., MARQUET R.L., JEEKEL J., LEGUIT P. Perioperative lavage promotes intraperitoneal adhesion in the rat. *Eur. Surg. Res.*, 1999, **31**, 196-201.

VANE J.R., MITCHELL J.A., APPLETON I., TOMLINSON A., BISHOP-BAILEY D., CROXTALL J., WILLOUGHBY D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 2046-2050.

VETILLARD J., DROUET M., NEILDEZ-NGUYEN T.M.A., MESTRIES J.C., MATHIEU J., THIERRY D., HERODIN F. Interleukine-8 acts as a strong peripheral blood granulocyte-recruiting agent rather than as a hematopoietic progenitor cell-mobilizing factor. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 1999, **8**, 365-379.

VIPOND M.N., WHAWELL S.A., SCOTT-COOMBES D.M., THOMPSON J.N., DUDLEY H.A. Experimental adhesion prophylaxis with recombinant tissue plasminogen activator. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 1994, **76**, 412-415.

VOSBECK K., TOBIAS P., MUELLER H., ALLEN R.A., ARFORS K.E., ULEVITCH R.J., SKLAR L.A. Priming of polymorphonuclear granulocytes by lipopolysaccharides and its complexes with lipopolysaccharide binding protein and high density lipoprotein. *J. Leukoc. Biol.*, 1990, **47**, 97-104.

VOGELMEIER C., BIEDERMANN T., MAIER K., MAZUR G., BEHR J., KROMBACH F., BUHL R. Comparative loss of activity of recombinant secretory leukoprotease inhibitor and alpha 1-protease inhibitor caused by different forms of oxidative stress. *Eur. Respir. J.*, 1997, **10**, 2114-2119.

WALMSLEY J.P. Subacute colic caused by epiploic foramen incarceration of the small intestine in a horse. *Equine Vet. Educ.*, 1991, **3**, 13-15.

WARD J.L., FUBINI S.L. Partial typhlectomy and ileocolostomy for treatment of nonreducible cecocolic intussusception in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **205**, 325-328.

WEISS D.J., TRENT A.M., JOHNSTON G. Prothrombotic events in the prodromal stages of acute laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 986-991.

WEISS D.J., EVANSON O.A., McCLENAHAN D., FAGLIARI J.J., JENKINS K. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, **58**, 1376-1380.

WEISS D.J., EVANSON O.A., McCLENAHAN D., FAGLIARI J.J., DUNNWIDDIE C.T., WELLS R.E. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation of experimentally induced laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 1998, **59**, 814-817.

WEISS S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 365-376.

WHITE N.A., MOORE J.N., TRIM C.M. Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 193-198.

WHITE N.A. The equine acute abdomen. Lea & Febiger : Philadelphia, 1990.

WILKINS B.M., SPITZ L. Incidence of postoperative adhesion obstruction following neonatal laparotomy. *Br. J. Surg.*, 1986, **73**, 762-764.

WINTERBOURN C.C., BRENNAN S.O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, **326**, 87-92.

WINTERBOURN C.C., BUSS I.H., CHAN T.P., PLANK L.D., CLARK M.A., WINDSOR J.A. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit. Care Med.*, 2000, **28**, 143-149.

YAO Y.M., REDL H., BAHRAMI S., SCHLAG G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm. Res.*, 1998, **47**, 201-210.

YARBROUGH T.B., SNYDER J.R., HARMON F.A., O'CONNELL K.A. Evaluation of myeloperoxidase concentrations in experimentally induced equine colonic ischemia and reperfusion. *Equine Vet. J.*, 1994, **26**, 67-69.

ZABUCCHI G., SORANZO M.R., MENEGAZZI R., BERTONCIN P., NARDON E., PATRIARCA R. Uptake of human eosinophil peroxidase and myeloperoxidase by cells involved in the inflammatory process. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, **37**, 499-508.

ZHENG H., CROWLEY J.J., CHAN J.C., RAFFIN T.A. Attenuation of LPS-induced neutrophil thromboxane B2 release and chemiluminescence. *J. Cell. Physiol.*, 1991, **146**, 164-269.

ZIMMERMAN B.J., GRISHAM M.B., GRANGER D.N. Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, 1990, **258**, G185-G190.

ZORATTI M., SZABO I. The mitochondrial permeability transition. *Biochem. Biophys. Acta*, 1995, **124**, 139-176.

DEUXIEME PARTIE

PRESENTATION SYNOPTIQUE DES RESULTATS

A. APPROCHE CLINIQUE DES PATHOLOGIES INTESTINALES CHIRURGICALES EQUINES (ETUDES 1 ET 2)

1. Matériel et méthode : Examens, interventions et traitements pratiqués sur les cas de coliques chirurgicales (récolte des données)

1.1. Présentation du protocole d'examen

Ces études se basent sur l'évaluation de deux cents cas de coliques chirurgicales. Le même protocole d'urgence abdominale (Fig. 7) a été utilisé dans notre service par le même personnel (Serteyn *et al.*, 1994). Il se compose d'une anamnèse détaillée qui considère les habitudes générales (habitat, alimentation, vermifugation, travail), les changements récents (alimentaires, travail) et tous ce qui concerne les signes de colique aiguë. L'examen général approfondi est axé d'une part sur le système cardio-vasculaire et d'autre part sur le système digestif. L'intubation naso-gastrique permet de déceler la présence de reflux gastrique. Le fouiller rectal systématique permet, dans la majorité des cas, de déterminer la partie intestinale atteinte. Le bilan sanguin détermine l'hématocrite, le nombre de leucocytes, le pH et le « base-excess » veineux, le taux en lactates, en urée, en protéines totales et en ions (Na^+ , K^+ et Cl^-). La paracentèse abdominale est également réalisée au moyen d'une aiguille ou d'une canule à bout mousse après incision au bistouri de la peau et de la paroi musculaire. Le liquide obtenu est évalué macroscopiquement et, dans certains cas, le nombre de leucocytes, d'érythrocytes et la concentration en protéines totales sont déterminés.

Fig. 7 Protocole d'examen (d'après Serteyn *et al.*, 1994)

PROTOCOLE D'URGENCE ABDOMINALE EQUINE				
DOSSIER :	PROPRIETAIRE :	DATE :	HEURE :	
ESPECE :	RACE :	SEXE :	AGE :	POIDS :
ASSISTANT :				
1. ANAMNESE				
1.1. Habitat :	<input type="radio"/> Box	<input type="radio"/> Box + prairie	<input type="radio"/> Prairie	Autre :
1.2. Utilisation :	<input type="radio"/> Trotteur	<input type="radio"/> Galopneur	<input type="radio"/> Obstacle	<input type="radio"/> Complet
	<input type="radio"/> Endurance			
	<input type="radio"/> Manège	<input type="radio"/> Attelage	<input type="radio"/> Traction	Autre :
1.3. Gestation :	Poulinage :			
1.4. Nourriture :	Composition :			
	Distribution :			
1.5. Changements récents :	<input type="radio"/> Nourriture	<input type="radio"/> Eau	<input type="radio"/> Médicament	<input type="radio"/>
Entraînement		<input type="radio"/> Compagnon	<input type="radio"/> Box	
Autre :				
1.6. Vermifugation :	Fréquence :	Date :		
	Marque :			
1.7. Pathologies antérieures / Accident récent :				
1.8. Antécédents chez d'autres chevaux du groupe :				
1.9. Dernière prise de nourriture :			Eau :	
1.10. Moment d'apparition des coliques :			Délais réf :	
1.11. Evolution de la douleur (avant traitement) :				
1.12. Sudation :				
1.13. Matières fécales :	<input type="radio"/> Absentes	<input type="radio"/> Sèches	<input type="radio"/> Normales	<input type="radio"/> Diarrhéiques
	Fréquence :			
1.14. Mouvements anormaux :				
1.15. Réponse à la marche :				
1.16. Traitement :	Médicament :	Date :	Heure :	Réponse :

2. EXAMEN GENERAL				
2.1. Condition physique :	<input type="radio"/> Cachectique	<input type="radio"/> Maigre	<input type="radio"/> Normal	<input type="radio"/> Embonpoint
2.2. Attitude : anormaux	<input type="radio"/> Dépression	<input type="radio"/> Normale	<input type="radio"/> Agité	<input type="radio"/> Mouvement
	Décrivez :			
2.3. Douleur :	<input type="radio"/> Absente	<input type="radio"/> Modérée	<input type="radio"/> Sévère	<input type="radio"/> Dépression
2.4. Température rectale : Arrivée :	Au calme :			
2.5. Poulx : Fréquence : Arrivée :	Au calme :			
	Amplitude : <input type="radio"/> Normale	<input type="radio"/> Augmentée	<input type="radio"/> Diminuée	<input type="radio"/> Imperceptible
	Pres. art. syst. :	Pres. art. diast. :	Press. art. moy :	
2.6. Respiration : Fréquence :	Arrivée :		Au calme :	
2.7. Muqueuses : Couleur :	<input type="radio"/> Pâle	<input type="radio"/> Rose	<input type="radio"/> Injectée	<input type="radio"/> Cyanosée
	TRC <input type="radio"/> Inférieur à 2 sec.	<input type="radio"/> De 2 à 4 sec.	<input type="radio"/> Supérieur à 4 sec.	
2.8. Température des pieds :	AG	AD	PG	PD
2.9. Température des extrémités :	Oreilles :			Queue :
2.10. Distension abdominale :	<input type="radio"/> Flanc gauche	<input type="radio"/> Flanc droit	<input type="radio"/> Les deux flancs	
2.11. Remarques (autres anomalies) :				

Présentation synoptique des résultats

3. EXAMEN SPECIAL DU SYSTEME DIGESTIF3.1. Auscultation abdominale

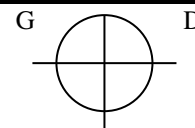
Bruits normaux : +

Augmentés : ++

Tympaniques : T

Diminués : -

Absents : 0

3.2. Intubation naso-gastrique3.2.1. Couleur : Vert Jaune Alimentaire Brunâtre

3.2.2. Volume :

 Spontané Non spontané Quantité :

3.2.3. Ph :

3.3. Fouiller rectal (systématique et dans l'ordre)3.3.1. Rate : Non palpée Normale Déplacée Distendue

3.3.2. Espace néphrosplénique

 Non palpé Normal Incarcération

3.3.3. Rein gauche :

 Non palpé Normal Déplacé Anormal3.3.4. Base du caecum : Non palpée Normale Déplacée Distendue Impactée

3.3.7. Courbure pelvienne :

 Non palpée Normale Déplacée Distendue Impactée Tordue Incarcération néphrosplénique

3.3.8. Colon flottant :

 Non palpé Normal Entérolithe/CEO

Dilaté

3.3.9. Intestin grêle :

 Non palpé Normal Anses dilatées et tendues Anses en accordéon

3.3.10. Vessie :

 Non palpée Normale Distendue

3.3.11. Anneaux inguinaux :

 Non palpés Normaux Anormaux

3.3.12. Autres remarques / grade (1-2-3) :

4. EXAMENS COMPLEMENTAIRES4.1. Paracentèse abdominale Non réalisée Réalisée Absence de liquide4.1.1. Couleur : Incolore Jaune pâle Jaune-vert Orange Rouge-brun

4.1.2. Caractéristiques spéciales :

 Contamination alimentaire Sang entier

4.1.3. Turbidité :

 Transparent Légèrement opaque Opaque

4.1.4. Analyses :

GR :

(No 20000/mm³)

GB :

(No 5000/mm³)

Bactéries :

 Présentes Absentes

Protéines totales :

(No 2g/dl)

Urée (UN) :

(No 23 mg/dl)

4.2. Biochimie et Hématologie

4.2.1. Hématocrite :

4.2.1. Lactate :

4.2.2. Urée :

Créatinine :

4.2.3. Na⁺ :Cl⁻ :K⁺ :

4.2.4. Protéines totales :

4.2.5. RBC :

4.2.6. WBC :

4.2.7. Gaz sanguin veineux :

5. CONCLUSIONS5.1. Diagnostic (suspicion)

Localisation :

Nature de la lésion :

5.2. Pronostic Bon Moyen Réservé Mauvais Très mauvais

Indice de gravité :

 1 2 3Indice de choc : 1 2 3 45.3. Traitement

Médical :

Chirurgical :

5.4. Soins intensifs Oui No

1.2. Développement de l'indice de gravité (IG)

Dans une étude antérieure, des paramètres cliniques évaluant le degré d'obstruction intestinale nous ont aidés à classer les cas présentant un accrochement néphro-splénique du côlon gauche suivant un indice de gravité (IG) afin de choisir entre un traitement chirurgical ou conservatif (Caudron *et al.*, 1996). Nous avons établi un indice de gravité composé de paramètres évaluant le degré d'obstruction intestinale pour classer tous les cas de coliques. Les critères choisis sont simples à estimer et, afin de faciliter la standardisation, une gradation en trois classes (absent/faible – modéré – sévère) nous a semblé la plus aisée même s'il s'agit de paramètres subjectifs.

1.2.1. Choix des paramètres cliniques

Les signes directs d'une obstruction intestinale sont l'absence de matières fécales, la présence de reflux gastrique, la distension abdominale externe et la distension des organes palpés au fouiller rectal. Il existe également des signes indirects comme la modification des bruits digestifs et la douleur abdominale. L'indice de gravité adapté spécialement pour l'accrochement néphro-splénique tenait compte de ces six paramètres. Comme l'indice de gravité doit être valable pour tous les types de coliques, même celles impliquant l'intestin grêle antérieur, l'absence de matières fécales nous a semblé peu significatif et ce critère a été exclu. Un autre critère à variabilité importante qui a été exclu est celui de la quantité de reflux gastrique. Une phase d'iléus transitoire peut induire ce reflux alors qu'il est absent dans d'autres cas où une distension gastrique sévère est due à un contenu compact.

Les quatre paramètres choisis pour l'indice de gravité sont donc le degré de distension abdominale, l'intensité et la fréquence des bruits digestifs, la possibilité d'exploration par fouiller rectal et le niveau de distension intestinale et enfin, l'intensité de la douleur en tenant compte des médications éventuelles. Ces paramètres sont classés en trois grades. C'est le paramètre de grade le plus élevé qui donne le classement du cas.

- Distension abdominale
 1. Absente
 2. Légère ou modérée dans un flanc
 3. Sévère, visible dans les deux flancs

- Bruits digestifs
 1. Normaux, voire augmentés
 2. Diminués partout ou absence dans un ou deux cadrans
 3. Absence plus généralisée
- Le fouiller rectal
 1. Exploration possible, distension localisée de l'intestin
 2. Exploration plus difficile, distension plus importante dans un flanc
 3. Exploration impossible, distension intestinale sévère
- Douleur
 1. Absente ou faible, réponse partielle aux analgésiques légers (p. ex. Novalgine)
 2. Modérée et plus continue, réponse partielle aux analgésiques plus puissants (Flunixin méglumine)
 3. Sévère et continue, brève réponse aux analgésiques puissants (α_2 -agonistes ou morphiniques) ou dépression ou déconnection

1.2. Choix d'un indice de choc (IC)

L'indice de choc est composé de six paramètres. Les paramètres cliniques sont la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire et la pression artérielle systolique tandis que les valeurs hématologiques et biochimiques sont l'hématocrite, la concentration sanguine en lactates et en urée (Tableau IV). Ici également c'est la valeur la plus élevée qui a donné le grade de l'indice de choc du cas. Si une donnée manque, l'indice est obtenu avec les paramètres relevés.

Tableau IV

Description des paramètres composant l'indice de choc (IC) et de la valeur de ces derniers en fonction du grade de l'IC.

	Indice de choc grade 1	Indice de choc grade 2	Indice de choc grade 3	Indice de choc grade 4
Fréq. cardiaque	< 60	60 – 80	80 – 100	> 100
Fréq. respiratoire	< 25	25 – 35	35 – 45	> 45
Pression art. syst. (mmHg)	> 110	90 – 110	70 – 90	< 70
Hématocrite (%)	< 45	45 – 55	55 – 65	> 65
Lactates (mg/dL)	< 75	< 75	75 – 100	> 100
Urée (mg/dL)	< 40	40 – 55	55 – 70	> 70

Fréq. = fréquence art. syst. = artérielle systolique

1.4. Traitement préopératoire

Avant l'induction de l'anesthésie, on administre un traitement antibiotique à la pénicilline sodique (20000 UI/kg), des anti-inflammatoires non stéroïdiens (flunixin méglumine, 1 mg/kg) et, en fonction des besoins, des perfusions hypertoniques et/ou isotoniques.

1.5. Anesthésie

La prémédication est réalisée par l'administration de xylazine (0,6 mg/kg). L'induction se fait à base de guaifenesine (100 mg/kg) et de thiopental (4 mg/kg) ou de midazolam (0,06 mg/kg) et de kétamine (2,2 mg/kg) (Gangl *et al.*, 2001). En cas de choc important (grade 3 ou 4), la prémédication peut être supprimée tout en gardant une bonne qualité d'induction grâce à l'utilisation de l'association midazolam/kétamine. L'intubation trachéale est réalisée immédiatement après l'induction et le cheval est transféré en salle d'opération. La maintenance est poursuivie par l'administration d'un mélange d'isoflurane et d'oxygène en circuit semi-fermé avec respiration contrôlée. L'utilisation du midazolam permet de diminuer le taux d'isoflurane nécessaire pour obtenir un stade d'anesthésie chirurgicale.

1.6. Chirurgie

Le placement du cheval en décubitus dorsal permet la préparation aseptique du site chirurgical. Une laparotomie est réalisée par une incision de 20 cm en avant de l'ombilic le long de la ligne blanche. L'exploration systématique de la cavité abdominale débute par le cæcum. En cas de tympanisme du gros intestin, une ponction-aspiration permet sa décompression. Les liquides et les gaz de l'intestin grêle distendu sont massés vers le cæcum. Dans certains cas d'impaction sévère ou d'entérolithe, une entérotomie de la courbure pelvienne ou du côlon flottant permet la vidange de l'organe. En cas de lésions vasculaires irrémédiables, estimées par l'aspect et la coloration de la séreuse l'intestin et l'absence de motilité après rétablissement de la vascularisation (Fig. 8a et b), une entérectomie de l'intestin grêle, du cæcum ou du côlon flottant est réalisée. Afin d'éviter des lésions de la séreuse intestinale, une irrigation continue par du liquide physiologique à température corporelle est effectuée pendant toute la durée de l'intervention. Une irrigation plus abondante, parfois additionnée d'antibiotiques, est réalisée

avant de refermer la cavité abdominale. La ligne blanche est fermée par des points de Blair-Donati et des points simples intercalés au Vicryl®2. Un surjet simple est posé sur le tissu sous-cutané (Vicryl®1) et des points simples sur la peau (Mersutures®0). Un pansement stérile est maintenu en place par un bandage élastique entourant tout l'abdomen et posé sur le cheval encore anesthésié, suspendu quelques instants par les membres avant le réveil. C'est la chirurgie qui permet de confirmer ou de poser le diagnostic exact.

Fig. 8a Lésions vasculaires légères de l'intestin grêle suite à une incarceration dans le foramen épiploïque (congestion, pétéchies, présence de motricité). **8b** Lésions vasculaires sévères de l'intestin grêle suite à une incarceration dans le foramen épiploïque (nécrose, absence de motricité)



1.7. Phase post-opératoire

1.7.1. Soins post-opératoires classiques

Les soins intensifs post-opératoires consistent en une surveillance étroite du cheval qui est soumis à un examen général toutes les deux heures afin de détecter de façon précoce toute complication éventuelle et au retrait du reflux gastrique à la même fréquence (Fig. 9). La sonde naso-gastrique est laissée en place jusqu'à disparition du reflux et reprise du transit digestif. Des perfusions à base de Ringer ou de Ringer-acétate isotoniques et de bicarbonates sont administrées afin de maintenir ou de restaurer l'hydratation ainsi que l'équilibre ionique et acido-basique.

L'antibiothérapie à large spectre est assurée par l'injection intraveineuse de pénicilline sodique (20000 UI/kg/8 heures) et de gentamicine (3 mg/kg/12 heures). Celle-ci est parfois remplacée par de l'enrofloxacin (2,5 mg/kg/12 heures) en cas de signes infectieux. De la flunixin méglumine est administrée à raison de 0,25 mg/kg/8 heures. Cette dose est parfois augmentée à 1,1 mg/kg afin d'atteindre l'analgésie. De l'énoxaparine, une héparine fractionnée, est administrée systématiquement (0,16 mg/kg) une fois par jour par voie sous-cutanée et, parfois, de l'acépromazine (0,04 mg/kg/8 heures) par voie intramusculaire. Des pansements assurant un support de la fourchette sont posés au niveau des sabots antérieurs afin de limiter le risque de fourbure. Des bilans sanguins réguliers sont effectués : hémocrite et analyse des gaz sanguins veineux toutes les 4 heures, taux de globules blancs et formule leucocytaire toutes les 12 heures, ions, protéines totales, urée et créatinine selon les besoins.

1.7.2. Définition du temps de récupération

Afin d'estimer plus exactement le délai de récupération chez les animaux survivants, un temps de récupération a été mesuré pour chaque cas. Il s'agit du nombre d'heures entre l'arrêt de l'anesthésie et le rétablissement du transit digestif ainsi que la normalisation du système cardio-vasculaire. Ces derniers sont évalués par quatre paramètres : la normalisation des bruits digestifs, la disparition du reflux gastrique, l'émission de matières fécales normales et la normalisation de la fréquence cardiaque (< 45 battements/minute). C'est à la fin du temps de récupération que les chevaux sont progressivement nourris avec du foin et des « mashés ».

1.7.3. Diagnostic et traitement des complications

L'état de choc est diagnostiqué sur base d'une augmentation de la fréquence cardiaque (> 80 battements/minute), d'une diminution de l'amplitude du pouls et de la pression artérielle systolique (< 90 mmHg), d'une augmentation du temps de remplissage capillaire, d'une hémococoncentration (hémocrite > 48 %) et d'une acidose métabolique (BE < -5). Les perfusions sont alors augmentées et des perfusions hypertoniques sont administrées selon les besoins. Le diagnostic d'iléus paralytique est posé lorsque 48 heures après l'intervention les chevaux présentent toujours du reflux gastrique ainsi qu'une diminution des bruits digestifs. Un traitement au métoclopramide (0,04 mg/kg/h toutes les 8 heures, voie intraveineuse) et au cisapride (1 mg/kg/8 heures, voie rectale) est alors instauré.

La péritonite aiguë est mise en évidence par la présence d'un état d'abattement prononcé, d'une diminution du transit et des bruits digestifs ainsi que par une leucopénie et/ou par une augmentation du nombre de globules blancs (GB) dans le liquide péritonéal (nombre de GB > à 100.000/ μ L). En général l'antibiothérapie est modifiée et des irrigations ou lavages péritonéaux sont réalisés avec du liquide physiologique additionné d'antibiotiques et d'héparine.

Un diagnostic d'entérite proximale est posé lors d'abattement et de reflux gastriques hémorragiques. Le traitement est surtout basé sur les perfusions adéquates et le retrait du reflux gastrique.

Une typhlocolite est suspectée lors d'abattement et de diarrhée profuse. Le traitement est basé sur l'administration de métronidazole (15 mg/kg/8 heures), de ferments lactiques et de charbon activé et sur le maintien de l'hydratation et de l'équilibre acido-basique par des perfusions.

2. Sélection des cas et analyse des données

2.1. Données sélectionnées pour l'analyse

Afin de tester la valeur pronostique de l'IG et de l'IC, nous n'avons retenu que les cas dont le dossier médical comporte l'issue finale ainsi que les éléments suffisants pour établir un diagnostic exact et dont l'animal a subi une laparotomie. Les chevaux euthanasiés pour des raisons financières ou d'autres raisons non-médicales ont été écartés. Tout cheval autorisé à quitter la clinique (en général quelques jours après l'arrêt des traitements) a été considéré comme animal survivant. Les données du dossier doivent contenir tous les éléments pour l'attribution de l'IG et au moins cinq éléments de l'IC. Un indice de gravité et de choc ont été attribués à chaque cas après l'examen de réception. Dans chaque cas, le délai entre l'apparition des coliques et le transfert en clinique a été noté. La localisation, le type d'obstruction et le diagnostic exact ont été également retenus. Afin de mieux évaluer les complications, le temps de récupération a été calculé pour chaque cas survivant. Nous avons calculé des moyennes des temps de récupération en fonction de la localisation et des indices de gravité et de choc. Pour chaque cas, la ou les complications majeures ont été notées.

2.2. Analyse statistique

La prévalence des affections de l'intestin grêle et du gros intestin a été calculée pour les différents grades de l'IG (= nombre d'affections d'intestin grêle/gros intestin divisé par le nombre total de chevaux du groupe donné). Le taux de survie a été estimé par la prévalence (= nombre de survivants divisé par le nombre total de chevaux du groupe donné) pour les deux localisations de coliques (intestin grêle et gros intestin), pour chaque grade de l'IG et de l'IC. L'hypothèse nulle d'un taux de survie identique dans les différents indices de gravité et de choc a été testée par un test de Chi-carré. La moyenne de la fréquence cardiaque et de l'hématocrite a été calculée pour les survivants et les morts.

Une méthode de régression logistique multivariée a été utilisée pour déterminer la relation entre la survie et la localisation (intestin grêle ou gros intestin), l'IG, l'IC, l'hématocrite et la fréquence cardiaque. Une procédure en étapes a été réalisée, afin de trouver le meilleur modèle pour les données (« logistic procedure », SAS). L'adaptation (« the fit ») des modèles successifs a été évaluée par la déviance et le « Aitken Information Criteria ». Le risque de mortalité (« odds ») est défini comme la probabilité de mort sur la probabilité de survie pour des chevaux ayant une même valeur pour la variable étudiée. Le « odds ratio » est le risque de mortalité divisé par le risque de survie ou encore exprimé sous la forme suivante : $\Psi = \exp. (a_1)$ où a_1 est l'estimation du paramètre (de la variable étudiée). Les résultats ont été considérés comme significatifs quand $P < 0,01$.

Pour l'étude de l'incidences des différentes pathologies, l'analyse statistique comprend un test du Chi-carré. Il est utilisé pour voir s'il existe une relation entre les taux de survie et l'IG et l'IC chez les chevaux atteints d'une pathologie de l'intestin grêle et chez les chevaux atteints d'une obstruction du gros intestin ($P < 0.05$). Une analyse de variance à deux critères est utilisée pour comparer les temps moyens de récupération chez les chevaux survivants selon la localisation de la pathologie (intestin grêle ou gros intestin) et l'IG d'une part et l'IC d'autre part ($P < 0.05$).

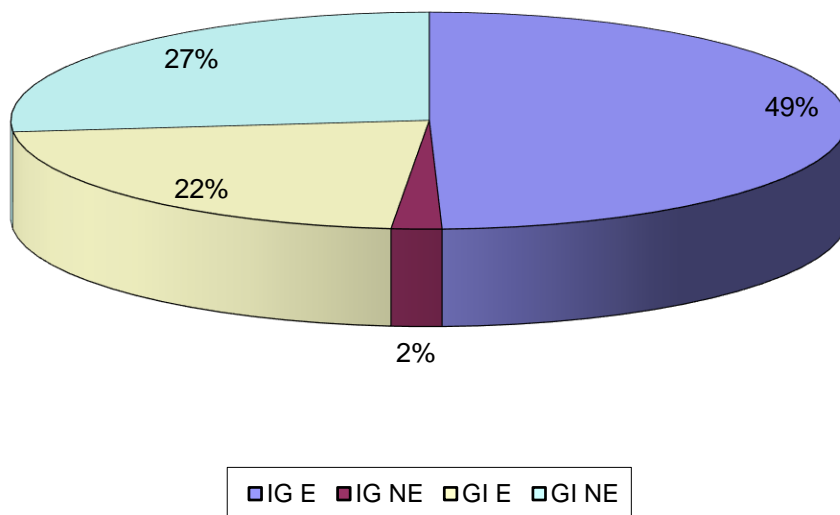
3. Résultats des études cliniques (études 1 et 2)

3.1. Incidence des différentes pathologies

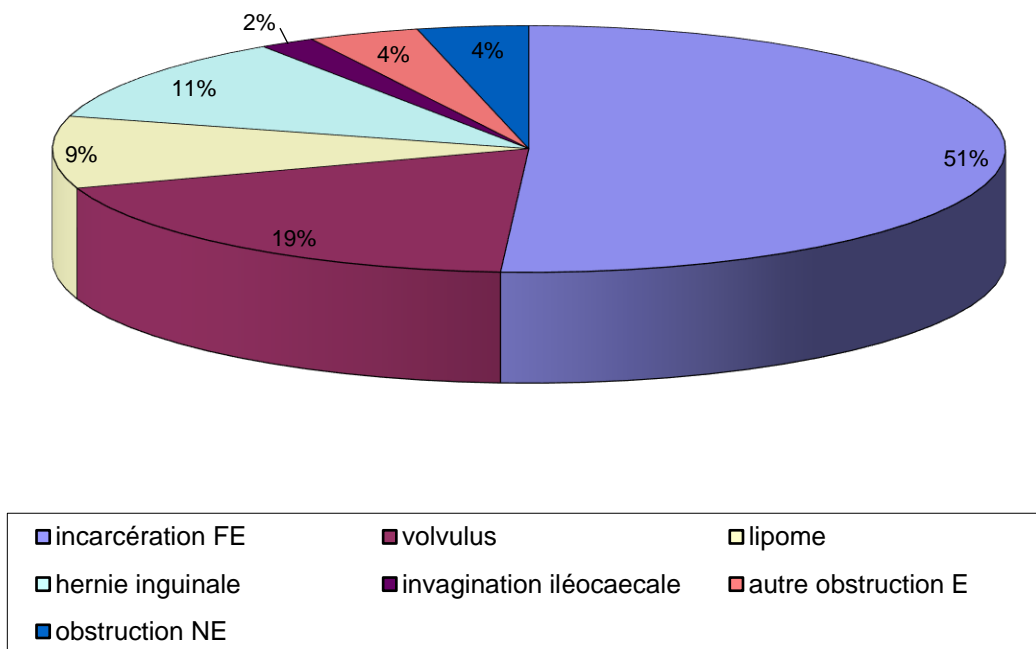
On observe un nombre quasi équivalent d'obstructions de l'intestin grêle (n = 106) et du gros intestin (n = 100). Les affections de l'intestin grêle sont essentiellement des obstructions étranglées (> 95 %) alors que les obstructions du gros intestin sont plus souvent non-étranglées (\pm 55 %) (Fig. 10). Près de la moitié des pathologies de l'intestin grêle sont des incarcerations dans le foramen épiploïque (Fig. 11). Dans 20 % des cas il s'agit de volvulus, dans 10 % des cas de hernies inguinales étranglées et dans 8 % des cas d'étranglements par un lipome pédonculé. Dans les 12 % de cas restants, il s'agit de pathologies diverses (incarcérations dans des défauts de mésentère, invaginations iléo-cæcales, hernie diaphragmatique et impactions de l'iléon). Les affections du gros intestin sont subdivisées en 26 % d'accrochements néphro-spléniques, 22 % de déplacements vers le haut et vers la droite de l'anse pelvienne et environ 7 % d'obstruction non étranglée du côlon flottant, 34 % de torsions ou volvulus du côlon replié, 6 % de torsions du cæcum et 5 % de pathologies diverses (invaginations cæco-coliques, hernie inguinale de l'anse pelvienne (Fig. 12), volvulus du côlon flottant).

Fig. 10

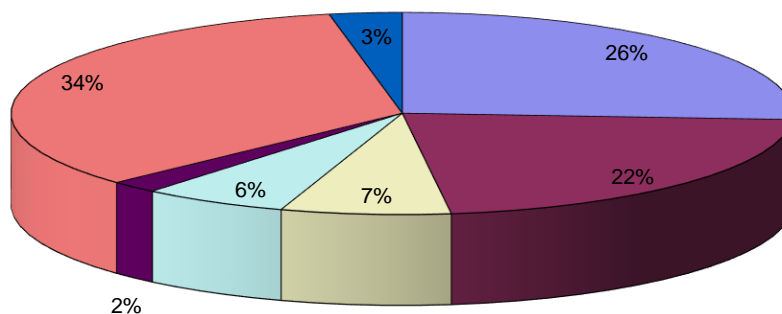
Distribution des pathologies chirurgicales (n = 206) en fonction de la localisation (intestin grêle ou gros intestin) et du type d'obstruction (étranglée ou non). (IG E : obstruction étranglée de l'intestin grêle NE : non étranglée GI E : obstruction étranglée du gros intestin).

**Fig. 11**

Incidence des différents types de pathologies chirurgicales sur les 106 cas d'obstructions de l'intestin grêle (FE : foramen épiploïque ; E : étranglée ; NE : non étranglée).

**Fig. 12**

Incidence des différents types de pathologies chirurgicales sur les 100 cas d'obstructions du gros intestin (AP : anse pelvienne ; NE : non étranglée).



■ accrochement néphro-splénique	■ déplacement en haut et à droite AP	□ obstruction NE côlon flottant
□ torsion caecum	■ invagination caecocolique	■ torsion côlon replié
■ divers		

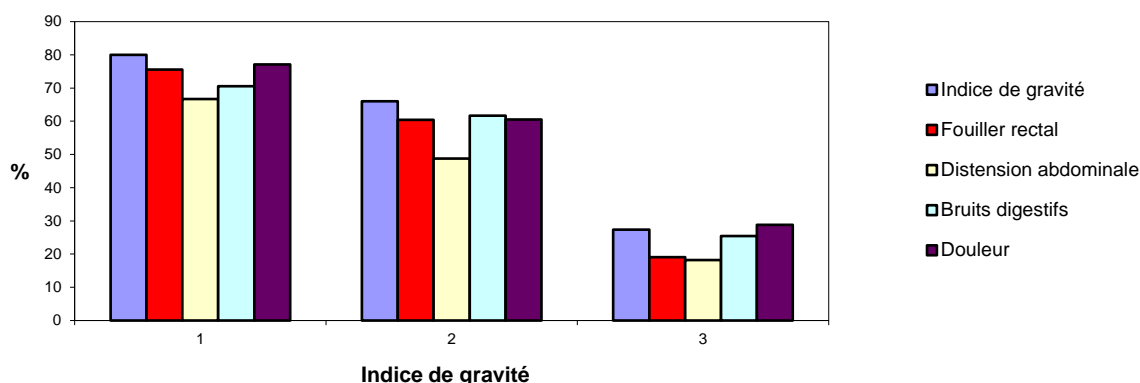
3.2. Taux de survie

Le taux de survie global est d'environ 52 à 54 % avec un taux significativement plus élevé pour les affections du gros intestin (61 à 64 %) par rapport à celles de l'intestin grêle (42 %). En excluant les cas présentant des lésions inopérables ou trop étendues pour permettre la survie et donc euthanasiés sur la table d'opération, on obtient un taux de survie total de 64 %, de 56 % pour l'intestin grêle et de 72 % pour le gros intestin.

3.3. Evaluation du pronostic par indice de gravité et indice de choc

Les résultats concernant l'évaluation du pronostic par l'IG montrent que les localisations des affections intestinales se répartissent de manière équivalente suivant les 3 grades de gravité. Le taux de survie est significativement différent dans les trois grades de l'IG : 80 % pour IG 1, 66 % pour IG 2 et 27,3 % pour IG 3 (Figure 13). Le risque relatif de mortalité (« odds ») est significatif pour le grade 3 par rapport au grade 1 : il est de 10,6. Pour les pathologies les plus fréquentes comme l'incarcération dans le foramen épiploïque et les obstructions étranglées du gros intestin, on observe également une différence similaire du taux de survie en fonction des trois grades de l'IG mais l'analyse statistique n'est pas possible suite au nombre de cas insuffisant dans certaines catégories.

Fig. 13 Taux de survie en fonction des 3 grades de l'indice de gravité et des ses composants.



L'analyse statistique n'a pu considérer que les catégories 1 à 3 de l'IC du fait du nombre réduit de cas en IC4. Ces cas ont été inclus dans le grade 3. Le taux de survie est également significativement lié aux différents grades et est respectivement de 68,8 % pour IC 1, de 49,1 % pour IC 2 et de 12,9 % pour IC 3/4. Le risque relatif de mortalité est de 10,8 pour le grade 3 par rapport au grade 1.

La moyenne de l'hématocrite des chevaux survivants s'élève à 39 % (± 6) et à 47 % (± 8) pour ceux qui n'ont pas survécu. Le risque relatif de mortalité (odds) augmente de 0,5 avec chaque augmentation d'un % de l'hématocrite. La moyenne de la fréquence cardiaque des survivants s'élève à 59 battements/minute (± 17) et à 71 battements/minute (± 21) pour ceux qui n'ont pas survécu. Le modèle de régression estime que ce paramètre n'est pas significatif ce qui est probablement dû au fait que les fréquences cardiaques des deux populations (de survivants et de morts) se recourent largement.

Le nombre de cas dans chaque grade de l'IC est significativement différent dans les différents grades de l'IG et on observe que, surtout pour l'IG 3, le taux de survie diminue drastiquement dès l'apparition de signes de choc (survie de 50 % en IG 3 et IC 1, de 0 % en IG 3 et IC 3). Ceci montre que les deux indices sont liés même s'ils ne contiennent pas les mêmes paramètres. Lorsque le modèle de régression logistique inclut dans le même modèle l'IG et l'IC, ce n'est que le grade 3 de l'IG et de l'IC qui sont considérés comme significatif. Les odds ratios sont de 7,1 pour IG 3 par rapport à IG 1 et de 7,2 pour IC 3 par rapport à IC 1.

3.4. Incidence des complications

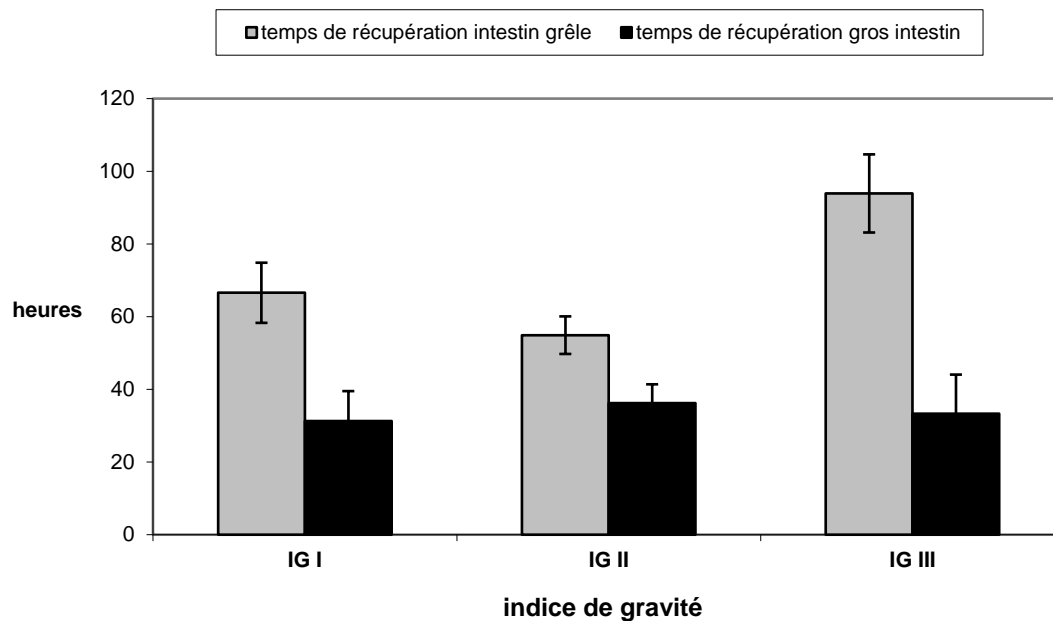
Les soins post-opératoires classiques ont permis d'éviter toute complication chez 79 chevaux sur 164 (42 euthanasies en phase per-opératoire). Des complications sont survenues chez 85 chevaux (58 %) et 58 d'entre eux ont dû être euthanasiés. La complication la plus fréquente est l'iléus paralytique (32 cas, 14 morts) et la complication la plus sévère l'état de choc (22 cas, tous morts). Les chevaux ont généralement été euthanasiés rapidement après le réveil en cas d'état de choc. Celui-ci peut être mis en relation avec une viabilité intestinale insuffisante. En fonction de la localisation de la pathologie, l'incidence des complications est significativement différente. Soixante-six pourcents des chevaux ayant eu une obstruction de l'intestin grêle ont présenté des complications contre seulement 39 % des chevaux souffrant du gros intestin. Contrairement à d'autres auteurs, nous observons plusieurs cas d'iléus paralytique post-opératoire dus à des déplacements du gros intestin, comme le déplacement vers le haut et vers la droite. Ceux-ci peuvent provoquer une occlusion de la lumière de l'intestin grêle sans atteinte vasculaire et une accumulation de liquide dans l'intestin grêle qui mène à un état de choc et à un iléus post-opératoire.

3.5. Temps de récupération

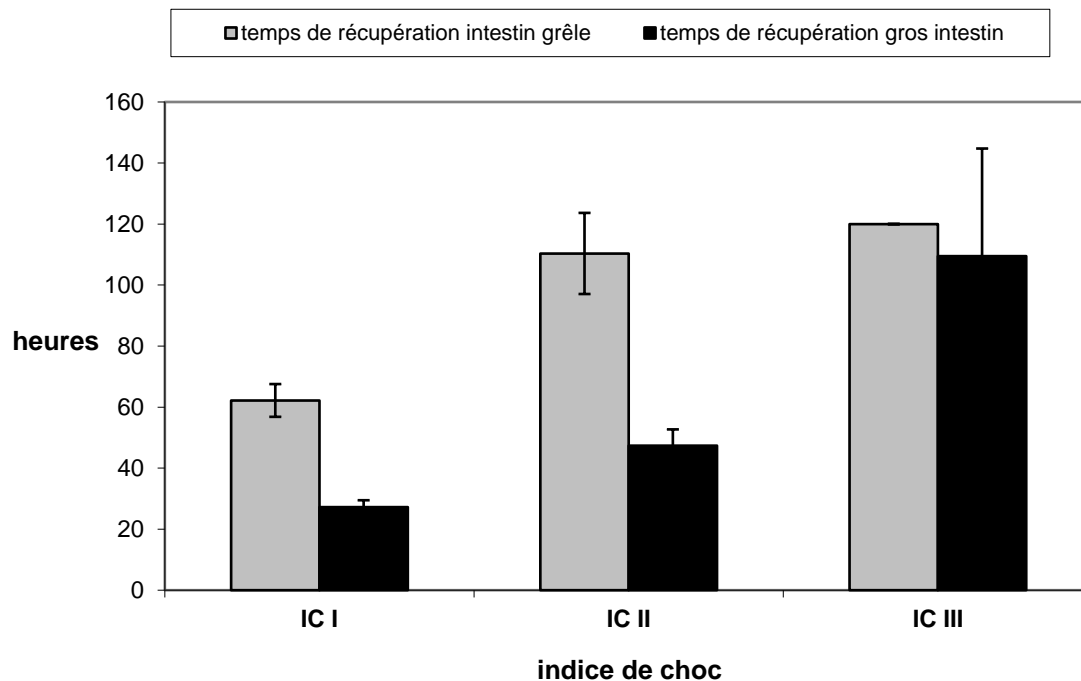
La différence dans les complications suite aux pathologies de l'intestin grêle et du gros intestin se reflète également dans le temps de récupération. Celui-ci est significativement plus élevé pour les pathologies de l'intestin grêle ($68,25 \pm 5,03$ heures) par rapport au gros intestin ($34,79 \pm 8,83$ heures). Le temps de récupération est significativement différent en fonction de l'indice de choc dans les deux localisations mais il ne varie pas en fonction de l'indice de gravité (Figures 14 et 15). Le calcul du temps de récupération permet de mieux standardiser le rétablissement du cheval en post-opératoire par rapport à d'autres études où l'importance des complications est peu décrite.

Fig. 14

Temps de récupération moyen (avec déviation standard) pour les affections de l'intestin grêle et du gros intestin en fonction de l'indice de gravité.

**Fig. 15**

Temps de récupération moyen (avec déviation standard) pour les affections de l'intestin grêle et du gros intestin en fonction de l'indice de choc.



4. Discussion

L'étude de l'incidence des pathologies dans notre région montre un taux important d'incarcérations dans le foramen épiploïque (27 % des coliques chirurgicales). Comme cette pathologie ne développe que des signes discrets dans un premier temps, il est important de procéder rapidement à un examen complet de tout cheval qui présente des coliques qui ne disparaissent pas définitivement après un traitement avec des analgésiques légers. Le pronostic s'assombrit effectivement fortement lors de l'évolution de la pathologie.

Cette étude montre que des paramètres cliniques permettent de poser un pronostic de manière satisfaisante. L'établissement de l'indice de gravité nous permet d'estimer le pronostic par des moyens très simples alors que certains autres modèles de probabilité de survie peuvent être lourds à utiliser à cause de calculs complexes peu adaptés à une situation d'urgence.

Malgré l'utilisation de traitements diminuant le développement de l'état de choc, les paramètres d'estimation du choc restent fiables pour l'établissement du pronostic. La présence d'un état de choc implique un pronostic réservé car il reflète généralement des lésions intestinales sévères. C'est pour cette raison que, même si les deux indices ne mesurent pas les mêmes paramètres, ils sont tout de même liés. L'attribution des indices de gravité et de choc permet une description standardisée des cas de coliques. Ce qui permettra de regrouper des pathologies très différentes dans des études ultérieures.

En ce qui concerne les complications, la proportion importante d'iléus paralytique semble liée à la forte incidence de pathologies étranglées de l'intestin grêle. Au cours de l'étude rétrospective, on observe une diminution dans le temps de l'incidence de certaines complications comme la fourbure. Ceci montre l'efficacité du suivi et des traitements préventifs instaurés. En particulier l'héparine fractionnée montre une réelle efficacité, alors qu'elle ne semble pas être utilisée couramment dans d'autres cliniques. Les mécanismes exacts de ses effets bénéfiques restent à démontrer. La fréquence de l'état de choc et sa gravité montrent que d'autres études sont nécessaires afin de réduire le taux de mortalité qui en résulte. Comme une majorité de chevaux présente des complications pendant la phase post-opératoire, une meilleure connaissance des mécanismes pathogènes et le développement d'autres traitements pourraient contribuer à une convalescence plus rapide.

B. APPROCHE BIOCHIMIQUE : ÉTUDE DE LA MYÉLOPEROXYDASE, DE LA TRYPSINE ET DU PANCRÉAS

1. Myéloperoxydase (MPO) (études 3-5)

1.1. Introduction : Justification de l'intérêt porté à la MPO

Suite aux obstructions intestinales, surtout étranglées, on observe une résorption d'endotoxines (Moore *et al.*, 1981). Ces endotoxines stimulent la production de diverses cytokines comme le tumor necrosis factor- α (TNF α) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) par les leucocytes et essentiellement les monocytes (Morris, 1991 ; Morris *et al.*, 1991). Par contre, l'implication des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) dans le domaine du choc endotoxique a été moins étudiée chez le cheval. Les PMN jouent un rôle majeur dans la défense contre les microorganismes par la production de formes activées de l'oxygène et de l'azote (RNOS) lors de la flambée respiratoire. Cela implique le fonctionnement de la NADPH-oxydase, de la myéloperoxydase (MPO) et de la NO-synthase. Ces RNOS détruisent les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (Klebanoff, 1999). Chez l'homme l'activation des PMN en cas de choc mène à la généralisation de l'inflammation et contribue à la défaillance multisystémique (Yao *et al.*, 1998). Les enzymes libérées par le PMN activé sont reconnues comme marqueurs plasmatiques de l'activation des PMN. Ce sont surtout l'élastase et la MPO (Faymonville *et al.*, 1991 ; Nuijens *et al.*, 1992 ; King *et al.*, 1997). D'autres organes, comme les poumons, sont des cibles de l'activation leucocytaire dans tout phénomène de choc chez l'homme et dans d'autres espèces animales (Yao *et al.*, 1998 ; Ishii *et al.*, 2000 ; Schmid-Schonbein *et al.*, 2001) mais actuellement cela n'est pas démontré chez le cheval.

L'effet des endotoxines ou lipopolysaccharides (LPS) sur les PMN est contesté jusqu'à présent. Certaines études montrent une activation et une stimulation des PMN qui produisent des RNOS sous l'influence des cytokines produites par les monocytes, mais l'effet direct des LPS n'est pas montré (Seethanathan *et al.*, 1990 ; Bochsler *et al.*, 1992). Dans des études sur les PMN équins *in vitro*, il est démontré que les LPS ne stimulent pas directement les PMN car la réponse de la chimioluminescence est très variable. Suite à la préincubation des LPS dans du plasma autologue ou du sang entier, la chimioluminescence des PMN augmente de façon

significative et de manière dose dépendante en présence des LPS (Benbarek *et al.*, 1997 et 1998). Les LPS se lient à des protéines plasmatiques, comme LPS-binding protéine et glycoprotéines (CD11a/CD18). Les complexes formés se lient à leur tour aux récepteurs membranaires des PMN (Shapira *et al.*, 1995). Il existe une liaison préférentielle aux récepteurs CD14 solubles (sCD14) ou membranaires (mCD14) présents sur les monocytes/macrophages et les neutrophiles. Le complexe LPS-sCD14 peut se fixer sur des récepteurs de surface de cellules qui ne possèdent pas de mCD14 comme les cellules endothéliales ou épithéliales (Ulevitch et Tobias, 1995).

Chez le cheval, divers auteurs ont montré une augmentation de l'activité de la MPO pendant la phase de reperfusion intestinale ainsi que dans des lésions de colite aiguë (Yarbrough *et al.*, 1994 ; McConnico *et al.*, 1999). L'activité de la MPO au niveau tissulaire est corrélée à l'infiltration en granulocytes et permet de quantifier le processus inflammatoire (McConnico *et al.*, 1999).

Etant donné l'importance des PMN et de la MPO dans les phénomènes inflammatoires et septiques, une étude de cette enzyme chez le cheval présentant des obstructions étranglées nous a semblé intéressante. Le dosage de la MPO plasmatique permettrait de déceler s'il y a une activation généralisée des neutrophiles dans les cas de choc endotoxique lié aux obstructions étranglées. Pour réaliser ce dosage, non disponible actuellement, il fallait d'abord purifier la MPO équine (MPOE) puis mettre au point une technique de mesure fiable.

1.2. Purification et dosage de la myéloperoxydase équine (MPOE)

Il existe différentes méthodes de dosage de la MPO. Les méthodes enzymatiques développées en médecine humaine peuvent être utilisées chez le cheval. Celles-ci ne sont pas entièrement spécifiques de la MPO car d'autres peroxydases peuvent interférer, sauf si la technique mesure l'activité de chlorination, mais ce type de mesure est très difficile dans le plasma. De plus, comme la MPO se lie à l'albumine plasmatique et perd son activité, les méthodes enzymatiques ne peuvent être utilisées dans le plasma. Les méthodes immunologiques développées pour la MPO humaine ne peuvent être utilisées pour la MPOE puisque la structure en acides aminés paraît différer entre l'homme et le cheval. Les anticorps obtenus pour la MPO humaine ne reconnaissent pas la MPOE. Dans un premier temps nous

avons donc purifié l'enzyme équine (MPOE) afin de développer ensuite un dosage radio-immunologique applicable aux milieux complexes comme le plasma.

1.2.1. Purification de la MPOE (Etude 3)

La première étape de la purification de la MPOE a été l'isolement des PMN équins à partir de 30 litres de sang récolté sur citrate. Une centrifugation sur gradient de densité (Ficoll-Paque) a permis de séparer les PMN des autres cellules. Par la suite, les PMN ont été collectés et congelés à -20°C . Nous avons adapté les techniques de Bakkenist et collaborateurs (1978) et de Matheson et collaborateurs (1981) déjà utilisées pour la purification de la MPO humaine (Mathy-Hartert *et al.*, 1996). Les cellules congelées ont été suspendues dans du tampon acétate glacé additionné (extrait 2) ou non (extrait 1) d'un détergent cationique et broyées au potter. Une dialyse et une précipitation ont permis d'éliminer la cathepsine G et l'élastase, mais seule l'extraction en présence de détergent (extrait 2) a permis d'éviter une co-précipitation de la MPOE. La MPOE a été purifiée par 2 étapes de chromatographie (échange ionique en gradient de NaCl suivie d'une filtration sur gel).

Trois pics de protéines ont été observés après chromatographie d'échange ionique et, comme pour la MPO humaine, la MPOE était absente du premier pic, faible dans le deuxième et importante dans le troisième. Le profil de chromatographie de filtration sur gel a montré deux pics de protéines dont seul le second possédait une activité MPO. On a obtenu 176 U ou 2,3 mg d'enzyme pure avec une activité spécifique de 74,3 U/mg après concentration des fractions actives. La pureté finale de la MPOE a été vérifiée par une électrophorèse en gel sur échantillons réduits ou non-réduits. Les gels ont été colorés pour les protéines (avec du bleu de Coomassie brillant), pour l'activité peroxydase de la MPO (par la réaction *in situ* à l'orthodanisidine) et pour les glycoprotéines (par la coloration de Schiff).

1.2.2. Dosages enzymatiques de la MPO (activité de peroxydase et de chlorination)

A chaque étape de la purification, la présence de MPOE a été confirmée par une mesure de l'activité peroxydasique de la MPO (mesure spectrophotométrique utilisant l'oxydation de l'orthodanisidine) liée à une mesure de la concentration en protéines (méthode de Folin-Ciocalteu ou procédure à l'acide bicinchonique). Une unité d'activité a été définie comme la quantité de MPO qui augmente l'absorbance d'une unité de densité optique par minute à 460

nm. L'activité de chlorination a été mesurée par la conversion du monochlorodimédon en dichlorodimédon (Hager *et al.*, 1966). La mesure de la chlorination a été utilisée pour confirmer la présence de MPO, pour estimer les besoins en Cl^- et les concentrations optimales en H_2O_2 et pour tester la dépendance au pH de l'activité de la MPO. L'unité d'activité a été définie comme la quantité de MPO qui produit une diminution de l'absorbance d'une densité optique par minute.

1.2.3. Développement d'un dosage radio-immunologique (RIA) de la MPOE (Etude 4)

1.2.3.1. Conditions générales de dosage

Un antisérum dirigé contre la MPOE a été obtenu par immunisation du lapin et a été utilisé pour l'établissement d'un RIA. La MPOE a été marquée à l' ^{125}I par une technique d'automarquage. Le RIA a été réalisé par une incubation d'antisérum dilué en présence de MPOE marquée et d'une solution de MPOE de référence non marquée ou de l'échantillon à analyser. Une incubation de l'antisérum avec la MPO marquée (sans MPO standard) permet de quantifier la liaison maximale du traceur à l'antisérum en absence d'antigène non marqué (B_0). Après une incubation de 18 heures à température ambiante, les complexes anticorps – antigène ont été isolés par une double précipitation (complexe antigène – anticorps en présence d'antigammaglobulines de lapin obtenues chez le mouton). L'activité spécifique a été déterminée par la méthode de l'auto-déplacement de l'antigène marqué en compétition avec l'antigène non-marqué. Dans nos conditions de travail, nous avons obtenu 30 % de liaison de l'anticorps marqué à l'antisérum à la dilution initiale de 1/40000, avec une faible liaison non-spécifique ($\leq 5\%$). L'antigène marqué est resté stable pendant 40 jours.

La liaison non-spécifique du traceur à l'antisérum a été mesurée par l'incubation de ^{125}I MPOE en absence de sérum anti-MPOE. Les résultats ont été exprimés comme le rapport de la quantité de traceur lié à l'antigène en présence (B) et en absence (B_0) de la MPOE non marquée, donc B/B_0 exprimé en %. Les rapports de B/B_0 ont été calculés pour les échantillons de plasma à tester pour le contenu en MPOE. Ils ont été reportés sur la courbe de référence afin d'obtenir une valeur de MPOE en ng/mL. Les courbes obtenues étaient typiques pour une courbe RIA standard. Des concentrations en MPO non marquée de 1 à 200 ng/mL ($n = 10$ pour chaque concentration) ont été utilisées pour établir la courbe de référence.

1.2.3.2. Caractéristiques du RIA : spécificité, sensibilité, précision, exactitude et reproductibilité

La spécificité de l'antisérum a été déterminée par la recherche d'une réactivité croisée de l'antisérum avec d'autres protéines plasmatiques équines (albumine, hémoglobine) et avec le contenu total en protéines des plaquettes, lymphocytes, monocytes, éosinophiles et neutrophiles. Il n'y avait aucune réaction croisée avec l'albumine et l'hémoglobine équines. Dans les plaquettes, lymphocytes et éosinophiles aucune concentration en MPOE n'était mesurable. Les neutrophiles avaient une concentration en MPOE de 5-8 ng/ μ g de protéines des neutrophiles, alors que les monocytes n'en contenaient que $\pm 0,5$ ng. Le contenu protéique a été mesuré après homogénéisation des cellules isolées. La liaison non-spécifique du RIA était faible ($\leq 5\%$ en B/B_0).

La sensibilité a été définie par la quantité minimale de MPOE non marquée qui a entraîné une réduction du pourcentage de traceur lié à l'anticorps supérieure au double de la déviation standard calculée sur 10 déterminations de B_0 (= 1,9 ng/mL).

La précision a été estimée par le coefficient de variation calculé pour 10 mesures de chaque concentration standard de MPOE.

L'exactitude a été estimée par la récupération de quantités connues de MPOE (10, 20 et 50 ng/mL) ajoutées à un échantillon de plasma. La récupération des quantités de MPOE ajoutée était de $93 \pm 4\%$.

La reproductibilité a été mesurée par le coefficient de variation calculé pour au moins 5 déterminations du même échantillon : il n'a pas dépassé 6 à 8 % pour les valeurs de MPOE entre 2 et 60 ng/mL.

1.2.4. Caractéristiques de la MPOE et effet du mode de prélèvement

L'électrophorèse de la MPOE purifiée révèle un poids moléculaire similaire à la MPO humaine avec des bandes à 150, 88 et 40 kDa correspondant à l'enzyme mature (150 kDa), à l'hémi-enzyme (88 kDa) et à une forme immature ou partiellement lysée (40 kDa). Les bandes à 88 et 150 kDa ont une activité de peroxydase et ce sont ces parties qui présentent une

glycosylation. Après rupture des ponts disulfures, la bande à 88 kDa est renforcée et une sous-unité de 62 kDa apparaît. Le spectre d'absorbance, avec un pic à 430 nm, est similaire à celui de la MPO humaine et caractéristique des enzymes hémiques. L'activité enzymatique présente la même dépendance au pH que l'enzyme humaine (activité optimale à pH 5,5). Les prélèvements sanguins sur tube avec l'EDTA comme anticoagulant (1 mg/mL) présentent des taux de MPOE stables, et même une centrifugation retardée ne les modifie pas, contrairement à ce qui se passe lors de prélèvements sur tube sec ou avec d'autres anticoagulants.

1.2.5. Valeurs de référence de MPOE chez le cheval sain, effets du transport et de l'anesthésie

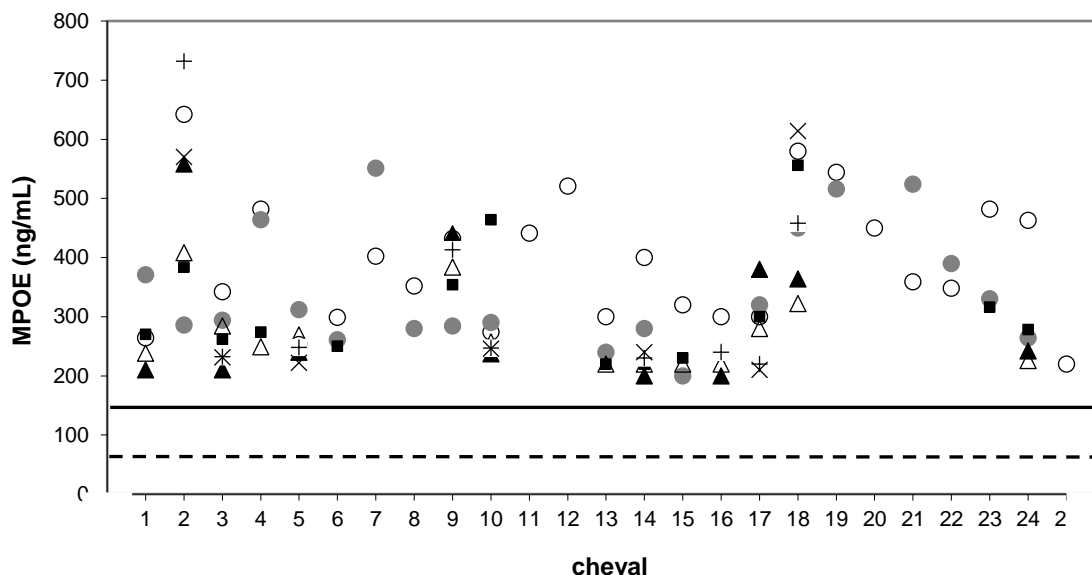
Des valeurs physiologiques de référence ont été déterminées chez 48 chevaux sains. La moyenne est de $69,5 \pm 19,4$ ng/mL avec des valeurs qui s'étendent de 28 à 114 ng/mL. La valeur physiologique maximale a été fixée à 128 ng/mL, égale à la moyenne + 3 déviations standard, réduisant ainsi le risque d'erreur à $p < 0,01$. Des variations dans les limites physiologiques ont été observées au cours de la journée. Ni le stress du transport (8 cas), ni une anesthésie pour chirurgie de routine (17 cas) n'ont influencé de manière significative la MPOE circulante.

1.3. Evolution de la MPOE plasmatique dans la pathologie abdominale aiguë

Nous avons étudié une première série de 25 cas de coliques dont 15 obstructions du gros intestin, 9 pathologies de l'intestin grêle et un cas de péritonite septique. Six de ces chevaux ont survécu tandis que 19 sont morts. Le taux plasmatique de MPOE (de 200 à 732 ng/mL) de tous ces chevaux dépassait significativement la valeur physiologique maximale (128 ng/mL) (Fig. 16).

Fig. 16

Variation du taux plasmatique de MPOE chez 25 chevaux souffrant de pathologies abdominales aiguës. Valeurs obtenues à la réception (○), pendant l'anesthésie (●), à la fin de l'anesthésie (■), 4 h (△), 8 h (▲), 12 h (+) et 16 h (x) après l'intervention. - - - valeur physiologique (69.5 ng/mL) et — limite physiologique maximale (129 ng/mL).

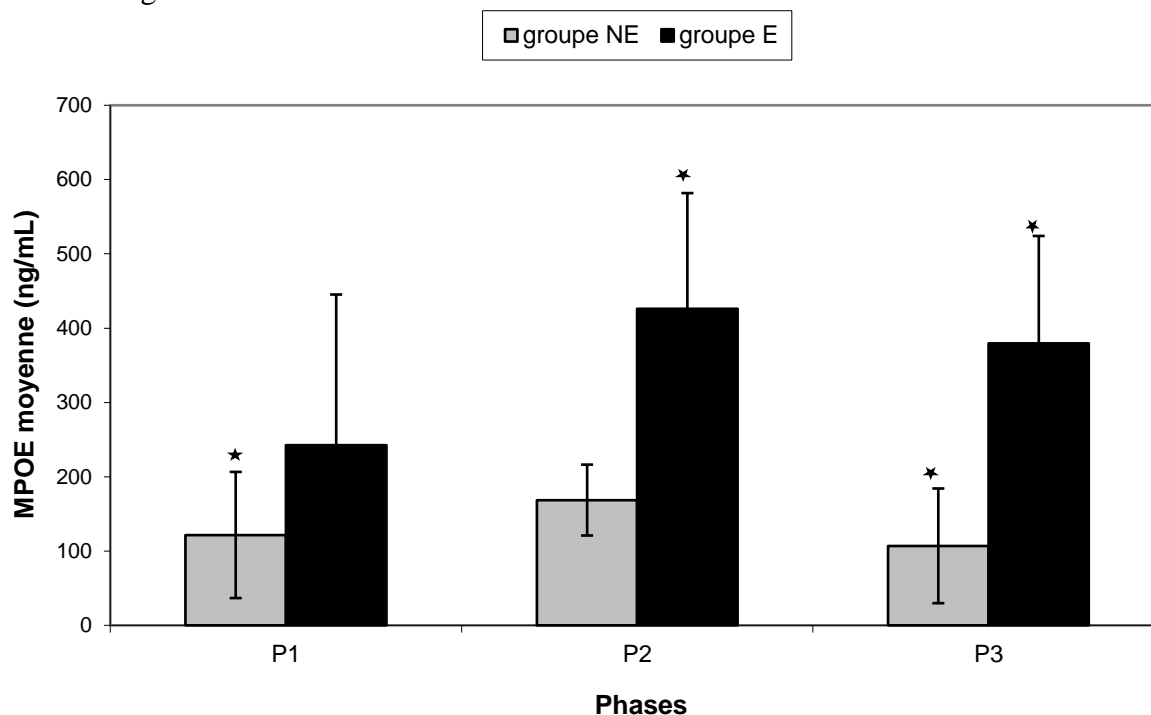


1.4. Evolution de la MPOE plasmatique dans l'obstruction du gros intestin (Etude 5)

Une autre étude a comparé les taux plasmatiques de MPOE dans neuf cas d'obstruction non étranglée du gros intestin (sans signe de choc, IG 1 ou 2), et 6 cas d'obstruction étranglée du gros intestin (IC 1 ou 2 et IG 3 sauf un en IG 2). La MPOE et le nombre de leucocytes ont été déterminés à la réception du cas (P1), pendant l'anesthésie ou la phase de soins intensifs (P2) et lors de la stabilisation ou la phase terminale (P3). Entre 8 et 15 échantillons de sang ont été prélevés par cheval. La valeur pic de chaque phase a été choisie afin de comparer la concentration plasmatique de myéloperoxydase dans les différentes phases. L'analyse statistique a été réalisée au moyen d'une régression linéaire afin de tester l'effet de groupe et de phase avec les valeurs de « least square means » (LSM). Le seuil de signification était à $p < 0,05$.

Nous avons observé une différence significative des concentrations plasmatiques en MPOE en fonction des groupes et des phases. Les chevaux du groupe E (obstruction étranglée) avaient des taux de MPOE significativement plus élevés que ceux du groupe NE (obstruction non étranglée) et que les chevaux sains. L'augmentation la plus importante était observée en phase P2 (dans les deux groupes). En examinant les valeurs en série, nous constatons dans plusieurs cas une évolution avec des fluctuations importantes. Chez les chevaux survivants, un retour à la normale des valeurs de MPOE a été constaté en phase P3 alors que chez ceux qui n'ont pas survécu les taux sont restés élevés ($107 \pm 77,2$ ng/mL pour les survivants contre $379,5 \pm 144,6$ ng/mL pour ceux qui n'ont pas survécu du groupe gros intestin étranglé) (Fig. 17).

Fig. 17 Valeurs moyennes (et déviation standard, SD) des valeurs pics de MPOE obtenues aux phases P1 (réception), P2 (anesthésie et soins intensifs) et P3 (récupération ou complications sévères) pour les groupes de chevaux en obstruction non-étranglée (NE) et étranglée (E). * différence significative.



Le test de régression linéaire montre que les valeurs de « least square means » (LSM) pour P1 ($181,8 \pm 31,4$ ng/mL) sont significativement différentes de P2 ($297,3 \pm 31,4$ ng/mL). Le nombre de leucocytes montre une diminution significative entre P1 et P3 ($10,6 \pm 1,1 \times 10^6/\mu\text{L}$ contre $6,6 \pm 1,1 \times 10^6/\mu\text{L}$) ($P < 0,05$). Une leucopénie intense a surtout été observée chez les chevaux du groupe E en P3 ($3,9 \times 10^6/\mu\text{L}$).

1.5. Discussion

Les taux plasmatiques élevés de MPOE indiquent une activation des PMN dans les cas d'obstruction intestinale aiguë. Ceci est surtout vrai dans les cas présentant une mortalité élevée comme lors d'obstruction étranglée du gros intestin. Les endotoxines résorbées par la muqueuse intestinale altérée peuvent activer directement les PMN par l'intermédiaire des protéines plasmatiques de liaison (Benbarek *et al.*, 1998). La résorption d'enzymes digestives actives via la muqueuse intestinale lésée pourrait également contribuer à l'activation des neutrophiles en produisant des peptides actifs, résultats d'une protéolyse locale (Mitsuoka *et al.*, 2000). Les PMN peuvent aussi être activés indirectement par les cytokines, comme le TNF- α , l'interleukine-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 libérées lors de l'activation des monocytes (Larrick et Kunkel, 1988). La différence significative du taux en MPOE entre les chevaux en obstruction non étranglée et étranglée pourrait être expliquée par une augmentation de résorption de LPS par la paroi intestinale ischémisée, ce qui contribuerait à une augmentation de l'activation des PMN.

Les taux élevés en MPOE sont associés à une leucopénie : il y aurait ainsi une activation leucocytaire locale ou systémique accompagnée de la diapédèse des PMN vers les tissus. Les produits de dégranulation des PMN se retrouvent néanmoins dans la circulation générale, ce qui indique que les PMN ont été activés et impliqués dans le développement du choc chez le cheval. Ces substances ainsi que le HOCl et dérivés produits par l'activité de la MPO joueraient un rôle important dans le développement de l'état de choc. Elles possèdent des effets cytotoxiques majeurs. La toxicité de la MPO, entre autres, vis-à-vis des cellules endothéliales est démontrée par des cultures de cellules endothéliales mises en contact avec H₂O₂ et MPO (Benbarek *et al.*, 2000). Dans les cas subissant des complications sévères et irréversibles, les concentrations plasmatiques de MPOE restent à un niveau très élevé alors que pour ceux qui récupèrent sans complication, elles retournent aux valeurs normales. La valeur pronostique éventuelle d'une mesure des taux plasmatiques de MPO mériterait d'être établie sur un nombre plus élevé de cas.

2. Trypsine et pancréas (études 6-8)

2.1. Introduction : Justification de l'intérêt porté à la trypsine et au pancréas.

La libération d'enzymes pancréatiques dans le plasma ont été étudiées sur plusieurs modèles animaux chez l'homme et plus récemment les relations avec l'activation leucocytaire ont été démontrées. Nous avons détaillé ces études dans la première partie de ce travail (pp. 67-73).

Une certaine résorption d'enzymes pancréatiques est physiologique chez l'homme (Diamond, 1978). Pour la lipase et l'amylase, une étude a établi des normes physiologiques plasmatiques et péritonéales chez le cheval (Parry et Crisman, 1991). Par contre, on ne connaît pas les normes physiologiques des concentrations plasmatiques en trypsine chez le cheval. Il fallait donc d'abord développer un dosage spécifique chez le cheval et établir des valeurs de référence.

Le pancréas lui-même est un organe très peu étudié chez le cheval. Seuls quelques cas isolés de pancréatite chronique à éosinophiles d'origine parasitaire ou de pancréatite aiguë nécrosante sont décrits (Baker, 1978 ; Lilley et Beeman, 1981 ; Breider *et al.*, 1985 ; Hamir, 1987). Chez le cheval d'une manière similaire à ce qui est observé chez l'homme, une souffrance pancréatique pourrait être partiellement responsable de certaines complications post-opératoires et contribuer au développement d'une défaillance multi-systémique. Nous avons donc réalisé des examens histo-pathologiques de pancréas prélevés sur des chevaux souffrant de lésions intestinales irréversibles et d'état de choc sévère.

2.2. Dosage de la trypsine

Comme toute enzyme, la trypsine peut être détectée par un dosage enzymatique non lié à l'espèce ou par un dosage radio-immunologique. Ce dernier demande la purification préalable de la trypsine équine.

2.2.1. Dosage enzymatique de la trypsine (Etude 6)

La méthode de dosage enzymatique se base sur le clivage par la trypsine d'un substrat chromogénique de bas poids moléculaire, le carbobenzyloxy-L-valyl-glycyl-L-arginine-4-nitranilide (Svendsen *et al.*, 1972 ; Lottenberg *et al.*, 1983). Le test, adapté au plasma équin, est capable de détecter la trypsine libre et les complexes trypsine – α_2 -macroglobuline. La trypsine scinde la chaîne peptidique entre l'arginine et la nitranilide, et libère la paranitraniline qui est détectée par spectrophotométrie à 405 nm (à 25 °C). Chaque analyse, réalisée en triple exemplaire, utilise 50 μ L de plasma (lithium héparine). L'absorbance initiale de l'échantillon plasmatique est notée avant l'addition du substrat chromogénique (t_0) et est soustraite de l'absorbance finale lue 15 minutes (t_{15}) après l'addition du substrat. Afin de quantifier la trypsine active présente dans l'échantillon, une courbe standard est obtenue dans les mêmes conditions avec des concentrations croissantes connues de trypsine bovine (de 2 à 50 ng/mL). Les résultats sont exprimés en ng de trypsine active par mL de plasma. Le contenu en protéines totales est également mesuré afin de corriger les valeurs en fonction de la dilution, si nécessaire.

Cette technique a été utilisée pour la mesure de la trypsine dans les fluides biologiques chez l'homme et testée pour sa spécificité et sa sensibilité (Cullman et Dick, 1981 ; Lottenberg *et al.*, 1983). Afin de préciser la reproductibilité de la méthode chez le cheval, la trypsine de 10 plasmas normaux et 10 plasmas pathologiques a été dosée huit fois et le coefficient de variabilité (CV) a été calculé (CV = la déviation standard divisée par la moyenne, exprimé en %). Il se situait entre 0,5 et 5 %. Afin de vérifier la spécificité de la méthode, le substrat chromogénique a été utilisé avec d'autres protéases pancréatiques ou plasmatiques dérivées de l'activation leucocytaire, de la coagulation ou de la fibrinolyse telles que la chymotrypsine, l'élastase, la collagénase, les cathepsines et les protéases de la cascade du complément. Aucune réaction n'a été observée. Une centrifugation retardée des échantillons de sang n'a pas influencé les concentrations de trypsine.

2.2.2. Dosage radio-immunologique de la trypsine (Etude 7)

2.2.2.1. Purification de la trypsine

Nous avons suivi la technique précédemment décrite pour la purification de la trypsine humaine (Travis et Roberts, 1969 ; Brodrick *et al.*, 1978). Le pancréas équin (122 g) décongelé est découpé puis broyé à +4°C dans l'acide sulfurique. Le précipité obtenu après centrifugation est ré-extrait deux fois en milieu acide. Les trois surnageants réunis sont centrifugés pour éliminer noyaux et mitochondries. Le surnageant est traité à deux reprises par des concentrations croissantes de sulfate ammonique et le précipité final est dialysé, concentré et traité par chromatographie de filtration sur gel qui élimine environ 50 % des protéines pancréatiques. La mesure de l'activité trypsine est faite sur une fraction aliquote de chaque fraction d'élution après activation du trypsinogène en trypsine par addition de traces d'entérokinase. Les fractions les plus actives sont réunies, concentrées, dialysées puis activées par l'entérokinase pour libérer la trypsine à partir du trypsinogène (Geokas *et al.*, 1979). Cette activation est suivie d'une dernière étape de chromatographie d'affinité sur colonne greffée avec l'aprotinine selon la méthode de Malvano et collaborateurs (1980). La colonne d'affinité est éluée avec trois tampons, ce qui permet de détacher l'enzyme fixée sur la colonne grâce au 3^{ème} tampon à pH acide. On élimine ainsi toutes les protéines dont le poids moléculaire est proche de la trypsine.

Après concentration et dialyse finale, l'activité enzymatique et la concentration en protéines sont mesurées et la pureté de l'enzyme est estimée à 96 % (18,36 mg). L'électrophorèse en gel d'acrylamide montre une bande majeure d'un poids moléculaire de 24000 Da avec une bande mineure de poids moléculaire un peu plus élevé (traces de trypsinogène) et la présence de très faibles bandes vers 12 000 DA (fragments de dégradation). La dégradation de l'enzyme est rapide au cours du temps, même si elle est conservée à -70°C : elle conduit à la formation de deux fragments majeurs (poids moléculaire 15000 et 12000 Da) qui possèdent toujours l'activité enzymatique. L'électrophorèse de l'enzyme après traitement réducteur ne montre aucune bande supplémentaire indiquant que l'enzyme est monomérique. L'étude de son activité enzymatique montre une dépendance de l'enzyme vis-à-vis du Ca²⁺ et une inhibition par l'aprotinine, par l'inhibiteur extrait du soja, par l'azide et par la benzamidine, similaire aux inhibitions obtenues pour les enzymes humaine et bovine. Elle est aussi inhibée par l'albumine et le plasma équins.

- Mesure de l'activité de la trypsine

Tout au long des différentes étapes de purification, la présence de la trypsine est suivie par la détection de son activité enzymatique par la technique au substrat chromogénique (décrite ci-dessus).

2.2.2.2. Mise au point du dosage immunologique (RIA)

- Obtention de l'antisérum, marquage radioactif et caractéristiques du traceur

La trypsine équine purifiée a été utilisée pour l'obtention d'un antisérum chez le lapin (Vaitukaitis *et al.*, 1971). Le marquage radioactif de la trypsine équine est obtenu par fixation de ^{125}I en présence de chloramine T (Greenwood *et al.*, 1963). Une chromatographie de filtration sur gel est destinée à éliminer ^{125}I en excès. Les fractions les plus radioactives sont réunies et une chromatographie dans le même tampon phosphate sur un gel de filtration (ACA 44) élimine les formes dégradées de l'enzyme. Les fractions contenant la plus haute radioactivité sont réunies et diluées jusqu'à l'obtention d'une radioactivité comprise entre 35000 et 40000 cpm/100 μl . Ce traceur reste stable durant 40 jours (fixation à l'anticorps constante). L'antisérum est utilisé à la dilution de 1/6000 et la fixation de la trypsine marquée (40000 cpm/100 μl) à l'anticorps atteint son maximum (40 ± 5 % de fixation) après 4 heures d'incubation et reste stable jusqu'à 36 heures d'incubation, soit à 4°C soit à température ambiante. Les valeurs de fixation non spécifique se situent dans tous les cas entre 2 et 4 %.

- Méthode de dosage immunologique

Le dosage immunologique est basé sur la fixation de la trypsine à l'anticorps (formation du complexe antigène-anticorps) suivie de la séparation du complexe antigène-anticorps par immunoprécipitation en présence d'antigammaglobulines de lapin (obtenues chez le mouton) (technique du "double anticorps" = "double antibody radioimmunoassay") et du comptage de la radioactivité dans le précipité. Le dosage de la trypsine dans un échantillon inconnu est basé sur l'inhibition de la fixation de l'enzyme radioactive à l'anticorps par l'enzyme non marquée (compétition entre l'enzyme marquée et l'enzyme non marquée pour une quantité fixe d'anticorps qui se traduit par une chute de la radioactivité mesurée dans les précipités de complexes anticorps-trypsine). La valeur de trypsine dans l'échantillon est calculée d'après une courbe de référence obtenue avec des concentrations croissantes en trypsine non radioactive.

- Caractérisation du dosage immunologique et applications aux échantillons plasmatiques équins

Nous avons caractérisé le dosage immunologique de la trypsine pour sa spécificité (réaction croisée avec d'autres protéines plasmatiques), sa sensibilité (limite inférieure de détection), sa reproductibilité intra- et inter-essai (variation de mesure d'un échantillon inconnu au cours d'un même dosage ou lors de dosages différents) et son exactitude (addition d'une concentration connue en trypsine de référence dans un échantillon et mesure radioimmunologique). La sensibilité correspond à la quantité de trypsine qui provoque une diminution de la valeur de $B/B_0 \geq$ à la moyenne du $B_0 \pm 2 SD$. La reproductibilité est estimée par le coefficient de variation = $[SD/valeur\ moyenne] \times 100$. Le dosage radio-immunologique permet la détection de la trypsine dans une gamme de concentrations comprises entre 200 (limite supérieure) et 5 ng/ml (limite de sensibilité) et les courbes obtenues avec incubation à la température du laboratoire sont superposables à celles obtenues à $+ 4^\circ C$. Les coefficients de variation intra- et inter-essai ($n = 10$) ne dépassent pas 4% et 5,2 % respectivement pour les valeurs extrêmes de la courbe. Il n'y a pas de réaction croisée avec l'albumine équine ni avec les érythrocytes ou le contenu intracellulaire des leucocytes équins. L'exactitude est bonne puisque la récupération des quantités de trypsine ajoutées à un échantillon se situe à $91 \pm 6 \%$.

Nous avons établi les valeurs plasmatiques normales chez le cheval sain ($n = 20$) en utilisant du sérum et appliqué le dosage à la mesure de la trypsine plasmatique dans un nombre limité de cas pathologiques (obstructions intestinales, $n = 10$).

2.3. Trypsine : valeurs de référence et évolution des concentrations plasmatiques en cas d'obstruction intestinale

La comparaison des valeurs plasmatiques de trypsine utilise un test de Kruskal Wallis ANOVA non paramétrique et un modèle de régression linéaire (analyse de variance), tous deux avec le seuil de signification $p < 0,05$.

2.3.1. Valeurs normales chez les chevaux sains

2.3.1.1. Trypsine enzymatiquement active (TEA) (Etude 6)

Les valeurs de référence physiologiques ont été établies sur 38 chevaux sains. Les valeurs de trypsine enzymatiquement active (TEA) se situent entre 3 et 78 ng/mL avec une moyenne de 28,5 ng/mL ($\pm 19,2$). Nous avons ainsi établi comme valeur physiologique maximale la moyenne + trois déviations standard (SD), ce qui correspond à 86 ng/mL (probabilité d'erreur $p < 0,01$). Aucune variation n'a été observée en fonction de l'âge et du sexe. Toutefois, des chevaux d'âges extrêmes (poulains ou chevaux très âgés) n'ont pas été utilisés comme témoins. Sept chevaux hospitalisés pour des affections localisées des membres et en bon état général ont été choisis pour tester l'effet du transport et de l'anesthésie. Le transport ($n = 7$; $27 \pm 15,9$ ng/mL) et une anesthésie générale pour une chirurgie mineure ($n = 6$; 24 échantillons ; $31,7 \pm 17,5$ ng/mL) n'influencent pas le taux de trypsine de manière significative. Toutes les valeurs mesurées restent dans les normes physiologiques.

2.3.1.2. Trypsine immunoréactive (TIR) (Etude 7)

Le dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) a été réalisé sur les mêmes chevaux sains que pour la TEA. La moyenne est de $30 \pm 6,8$ ng/mL variant de 18,2 à 41 ng/mL. Cela correspond à une valeur physiologique maximale (valeur moyenne + 3 SD) de 50,5 ng/mL avec une probabilité d'erreur $p < 0,01$.

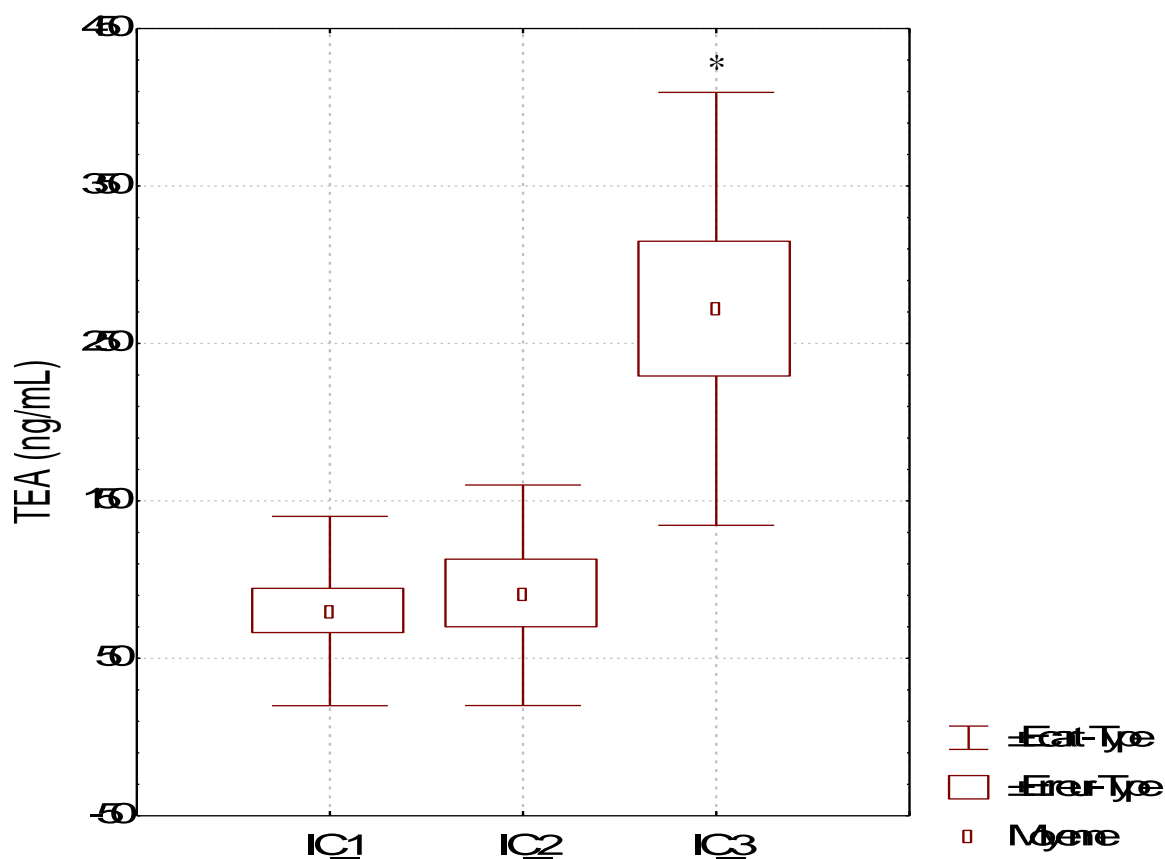
2.3.2. Variations des taux de TEA dans les cas d'obstruction intestinale (Etude 6)

Trente-sept chevaux souffrant de colique chirurgicale ont été utilisés dans cette étude. Dans ce groupe, 22 étaient atteints d'une affection de l'intestin grêle et 15 souffraient d'une obstruction du gros intestin. A la réception, 17 chevaux ne présentaient pas de signe de choc (IC 1), 10 d'entre eux avaient un IC 2, sept un IC 3 et trois un IC 4. Les chevaux présentant un IC3 ou IC4 ont été regroupés dans IC3.

Parmi ces 37 chevaux, 22 (59 %) avaient, lors de la réception, une valeur plasmatique de TEA significativement supérieure à la valeur physiologique maximale : valeur moyenne de $201,8 \pm 114,7$ ng/mL ($p < 0,05$). Chez les chevaux présentant une atteinte de l'intestin grêle la valeur moyenne était de $217,2 \pm 138,2$ ng/mL alors que les chevaux atteints d'une obstruction du gros intestin avaient une valeur moyenne de $174,9 \pm 51,9$ ng/mL. La différence n'était pas significative entre les deux localisations.

Sur l'ensemble des 37 cas étudiés, les variations de TEA sont significativement différentes suivant l'IC. Plus précisément, une différence significative était observée entre IC1 et IC3 d'une part et IC2 et IC3 d'autre part. Les chevaux du groupe IC 3 ont tous présenté des valeurs de TEA au-delà de la valeur physiologique maximale (de 120 à 625 ng/mL). La figure 18 montre les valeurs obtenues lors de la réception des chevaux regroupés selon leur IC.

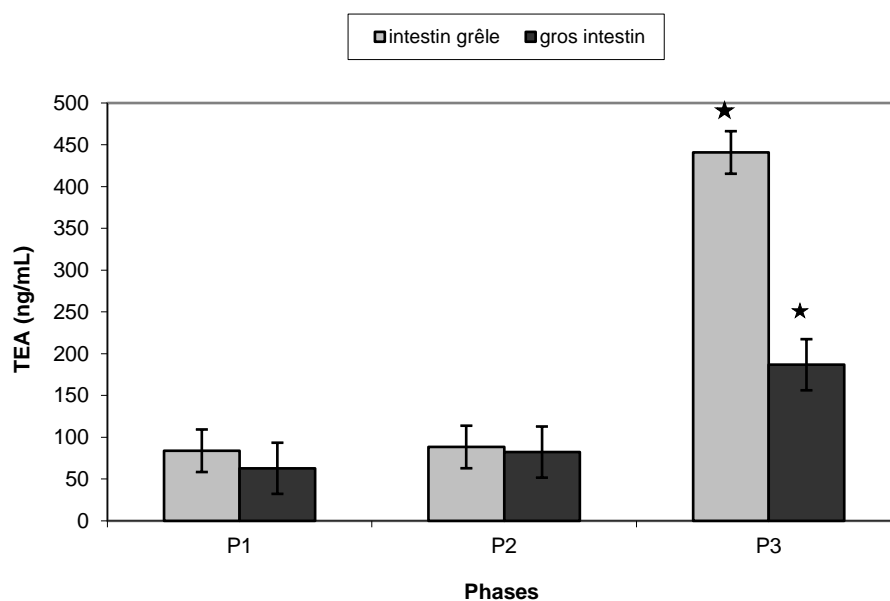
Fig. 18 Valeur moyenne de TEA obtenue à la réception pour les chevaux classés selon l'IC 1-3. La déviation standard (écart-type) et l'erreur-type sont indiquées. L'astérisque (*) indique une différence significative ($p < 0,01$).



2.3.3. Evolution de la TEA en période post-opératoire

L'évolution des valeurs de TEA en période post-opératoire a été étudiée sur 22 chevaux. Parmi eux, 17 ont survécu (9 atteintes de l'intestin grêle et 8 du gros intestin) et 5 sont morts (3 cas d'obstruction de l'intestin grêle et 2 du gros intestin). Les concentrations plasmatiques de TEA ont été mesurées à la réception (phase P1), lors de l'anesthésie (P2) et pendant la période post-opératoire (P3). Par cheval, 5 à 10 échantillons ont été analysés et les valeurs pics de chaque phase ont été retenues. Une augmentation significative de la concentration plasmatique de TEA a été observée pendant la phase post-opératoire (P3) dans l'ensemble du groupe. La concentration en TEA est significativement plus élevée dans les obstructions de l'intestin grêle (440,8 ng/mL en P3) que dans celles du gros intestin (186,8 ng/mL) (Fig. 19). En outre, les 7 chevaux sans complication post-opératoire ont présenté une concentration de TEA significativement plus faible ($161,9 \pm 33,3$ ng/mL, supérieure à la valeur physiologique maximale) que les chevaux avec complications (fatales pour 5 cas) ($497,5 \pm 381,8$ ng/mL ; $p < 0,0024$).

Fig. 19 Evolution de la TEA moyenne (et déviation standard) pendant les phases P1 à P3 pour les chevaux atteints d'une obstruction de l'intestin grêle et du gros intestin. Une augmentation significative est observée en P3 ainsi qu'entre les affections de l'intestin grêle et du gros intestin (*).



2.3.4. Evolution de la TIR plasmatique chez les chevaux en obstruction intestinale : résultats préliminaires (Etude 7)

Un indice de gravité et de choc ont été attribués aux chevaux en obstruction intestinale et des prélèvements de sang ont été réalisés lors de la réception (P1), pendant l'anesthésie (P2), en période post-opératoire précoce (≤ 24 h) (P3) et plus tard, soit lors de la récupération du transit soit lors d'apparition de complications sévères (P4). Les valeurs de TIR mesurées dans les obstructions intestinales non étranglées ($n = 3$) restent dans la gamme des valeurs normales jusqu'à 4 jours après l'admission (tableau V). Par contre, dans les obstructions intestinales étranglées ($n = 7$), les valeurs de TIR dépassent la limite supérieure dans 5 cas et peuvent atteindre des valeurs très élevées (jusqu'à 800 ng/ml). Chez deux chevaux de ce dernier groupe qui présentaient un volvulus de l'intestin grêle (cheval 10) et une torsion du côlon replié (cheval 13), avec une issue défavorable, les valeurs sont restées élevées dans tous les prélèvements (tableau VI).

Tableau V Evolution des concentrations plasmatiques en TIR (ng/mL) chez 3 chevaux souffrant d'obstructions intestinales non étranglées et sans signe de choc (IC 1). L'indice de gravité (IG) et le moment de prélèvement (P1 à P4) sont mentionnés.

N° CV	Type d'obstruction	IG	IC	P1	P2	P3	P4
				TIR (ng/mL)			
1	Impaction iléon	1	1	17	28	13	7
2	Déplacement GI	2	1	13	14	10	11
3	Déplacement GI	2	1	31	38	32	26

Tableau VI Evolution des concentrations plasmatiques en TIR (ng/mL) chez 7 chevaux souffrant d'obstructions intestinales étranglées (FE : incarceration foramen épiploïque ; GI : gros intestin). L'issue (S : survivant ; NS : non survivants), l'indice de gravité (IG), l'indice de choc (IC) et le moment de prélèvement (P1 à P4) sont mentionnés.

N° CV	Type d'obstruction	IG	IC	Issue	P1	P2	P3	P4
					TIR (ng/mL)			
4	FE iléon	2	1	S	19	50	19	96
5	FE iléon	2	2	S	17	14	17	7
6	Torsion GI	2	1	S	29	71	22	19
7	Torsion GI	3	2	S	230	98	34	20
8	FE jéjunum	3	2	NS	31	20	7	10
9	Volvulus jéjunum	3	3	NS	800	180	178	-
10	Torsion GI	3	1	NS	500	546	210	-

2.4. Pancréas (Etude 8)

Le pancréas humain et d'animaux de laboratoire a été étudié histo-pathologiquement au microscope optique chez des sujets en choc hypovolémique ou endotoxique. Dans certains cas, en particulier chez les sujets en choc septique, aucune lésion n'a été observée bien que la souffrance pancréatique ait été démontrée par une diminution des sécrétions du pancréas exocrine (Tribl *et al.*, 2000). Toutefois, dans l'étude de Tribl et collaborateurs (2000), les prélèvements ont été effectués jusqu'à 18 heures post-mortem et seule l'étude en microscopie optique a été réalisée, ce qui permet de mettre en doute ces résultats étant donné l'autolyse rapide de cet organe. D'autres études en microscopie optique ont permis d'observer une coagulation intra-vasculaire disséminée, un œdème et une nécrose graisseuse ainsi qu'une dégénérescence vacuolaire et graisseuse (Warshaw et O'Hara, 1978 ; Gmaz-Nikulin *et al.*, 1981). L'ultrastructure des cellules pancréatiques en souffrance a montré la présence d'œdème, une dilatation du réticulum endoplasmique, une diminution du nombre des granules de zymogènes, un gonflement des mitochondries, des corps résiduels et des vacuoles autophagiques montrant une fusion entre les granules de zymogène et des lysosomes (Jones *et al.*, 1975 ; Hegewald *et al.*, 1985 ; Florholmen *et al.*, 1988). L'existence de telles lésions chez les chevaux en coliques et en état de choc pourrait expliquer les concentrations plasmatiques de trypsine anormalement élevées, certaines complications post-opératoires ainsi que l'absence de réponse à leur traitement.

2.4.1. Prélèvement du pancréas

Des fragments de pancréas ont été prélevés sur des chevaux euthanasiés pour diverses raisons, telles que la présence de lésions intestinales jugées irréversibles, inopérables et/ou trop étendues ou la présence d'un état de choc irréversible. Ces sections ont été immédiatement immergées dans du formol à 10 % pour la microscopie optique. Des fragments de taille réduite (1 mm de diamètre) ont été plongés et coupés dans la glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon phosphate à pH 7,4 et conservés dans cette même solution à 4°C en vue d'un examen en microscopie électronique à transmission.

2.4.2. Préparation des coupes pour la microscopie optique

Après une fixation de 24 heures au moins dans du formol à 10 % (en volume), les tissus ont été découpés en morceaux d'une épaisseur de ± 4 mm avant l'inclusion du tissu à la paraffine. Des coupes de ± 3 mm ont été obtenues au microtome et séchées avant d'être colorées. Une coloration à l'hématoxyline (coloration des noyaux) et à l'éosine (coloration du cytoplasme et du collagène) (HE) a été réalisée. Les coupes ont été examinées au microscope optique (MO) avec un grossissement maximal de 1000 X.

2.4.3. Préparation des coupes pour le microscope électronique à transmission

Les fragments tissulaires ont été plongés dans une série de bains pour la postfixation : un bain en tampon phosphate à pH 7,4 à 4°C (trois fois 10 minutes), un bain de tétr oxyde d'osmium à 4°C pendant une heure avant le rinçage à l'eau bi-distillée (trois fois 10 minutes toujours à 4°C). Les bains suivants ont été placés à température ambiante : bains d'alcool à concentration croissante (50 % pendant 15 min, 70 % pendant 15 min, 95 % pendant 5 min, alcool absolu pendant 3 x 20 min). Avant de passer à l'enrobage en Epon®, les fragments ont été plongés dans une solution d'époxypropane pendant 2 x 30 minutes. Ensuite des bains d'une durée d'une heure avec un mélange d'Epon® et d'époxypropane à concentrations croissantes d'Epon® ont été réalisés avant de passer à de l'Epon® pur pendant 24 heures. Finalement une polymérisation dans de l'Epon® pur pendant 48 heures à 600°C a réalisé l'enrobage. Un ultramicrotome de type LKB 2128 a permis de réaliser des coupes ultrafines (immobilisées sur une grille de cuivre) qui ont été colorées à l'acétate de plomb et examinées par un microscope électronique (ME) de type Zeiss 910 de 80 KV avec un grossissement de 1600 à 12500 X.

2.5. Etude histo-pathologique du pancréas de cheval normal et en état de choc sévère

Trois chevaux qui ne présentaient pas de signe de choc endotoxique et qui ont été euthanasiés pour des fractures ont servi de témoins. Dix chevaux euthanasiés à cause de lésions intestinales sévères combinées dans certains cas à un état de choc profond ont également subi un examen pancréatique. Sur ces derniers cas, la TEA plasmatique a également été dosée lors de la réception. Chez un poney présentant des coliques chroniques en absence de signes de

choc, la TEA était encore dans les normes alors que, chez les autres chevaux, les valeurs de TEA dépassaient la valeur physiologique maximale de 86 ng/mL (tableau VII).

Tableau VII Par cheval : la durée des coliques avant le transfert en clinique, l'indice de choc (IC), le type de l'obstruction intestinale et le taux de TEA à la réception sont mentionnés (FE : foramen épiploïque).

N°	Durée des coliques avant transfert (heures)	IC	Type d'obstruction intestinale	TEA (ng/mL)
1	Chronique	1	Adhérences jéjunum et côlon	80
2	12	1	Étranglement par lipome	115
3	24	2	torsion du cæcum	170
4	12	2	Torsion du côlon replié	135
5	14	2	Incarcération FE de l'intestin grêle	140
6	60	2	Invagination cæcocolique non réductible	160
7	8	2	Volvulus de l'intestin grêle	95
8	8	2	Torsion du côlon replié	310
9	24	3	Hernie inguinale iléon	500
10	16	3	Incarcération FE de l'intestin grêle	255

2.5.1. Microscopie optique

La structure générale du tissu pancréatique est bien conservée dans toutes les coupes. Le pancréas exocrine équin a une organisation moindre en acini par rapport au pancréas d'autres espèces comme le chien et les rongeurs. Les îlots de Langerhans (pancréas endocrine) sont disséminés dans le tissu exocrine. Les témoins et les chevaux n° 1 et 2 du groupe pathologique ont un tissu bien conservé avec des cellules glandulaires de forme plus ou moins trapézoïdale. Le noyau est grand, hyperchromatique et se trouve en région parabasale. Le cytoplasme apparaît granuleux (Fig. 20).

Sur les fragments de pancréas de chevaux en état de choc sévère (n° 9 et 10), on observe la présence de vacuoles blanches de taille variable (phénomène de dégénérescence vacuolaire). D'autres cellules sont gonflées et à cytoplasme plus éosinophile ce qui plaide pour un œdème intracellulaire. Les bords cytoplasmiques des cellules exocrines ne sont pas bien définis. Dans certaines cellules les noyaux paraissent très pâles et peu contrastés ce qui suggère une lyse (Fig. 21).

Fig. 20 Pancréas exocrine, cheval n° 1. Structure bien conservée, cellules pyramidales, grand noyau hyperchromatique, cytoplasme granuleux. Microscopie optique, hématoxiline-éosine, grossissement 400 X.

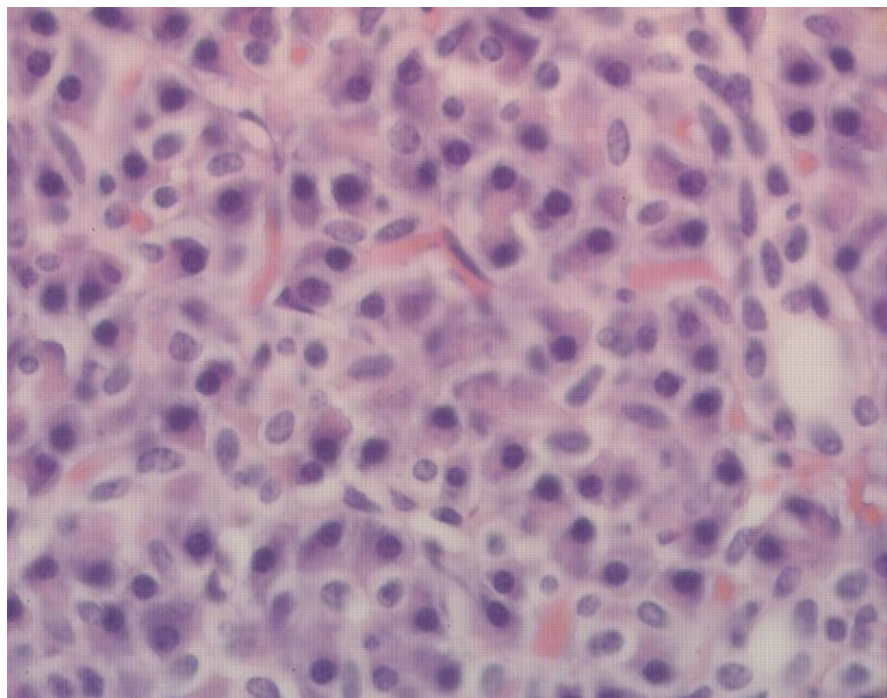
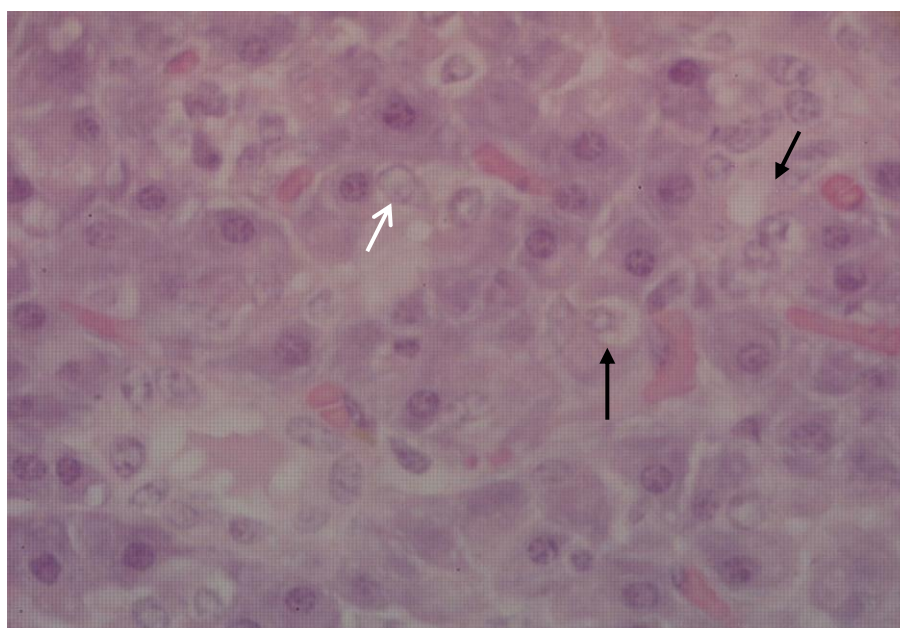


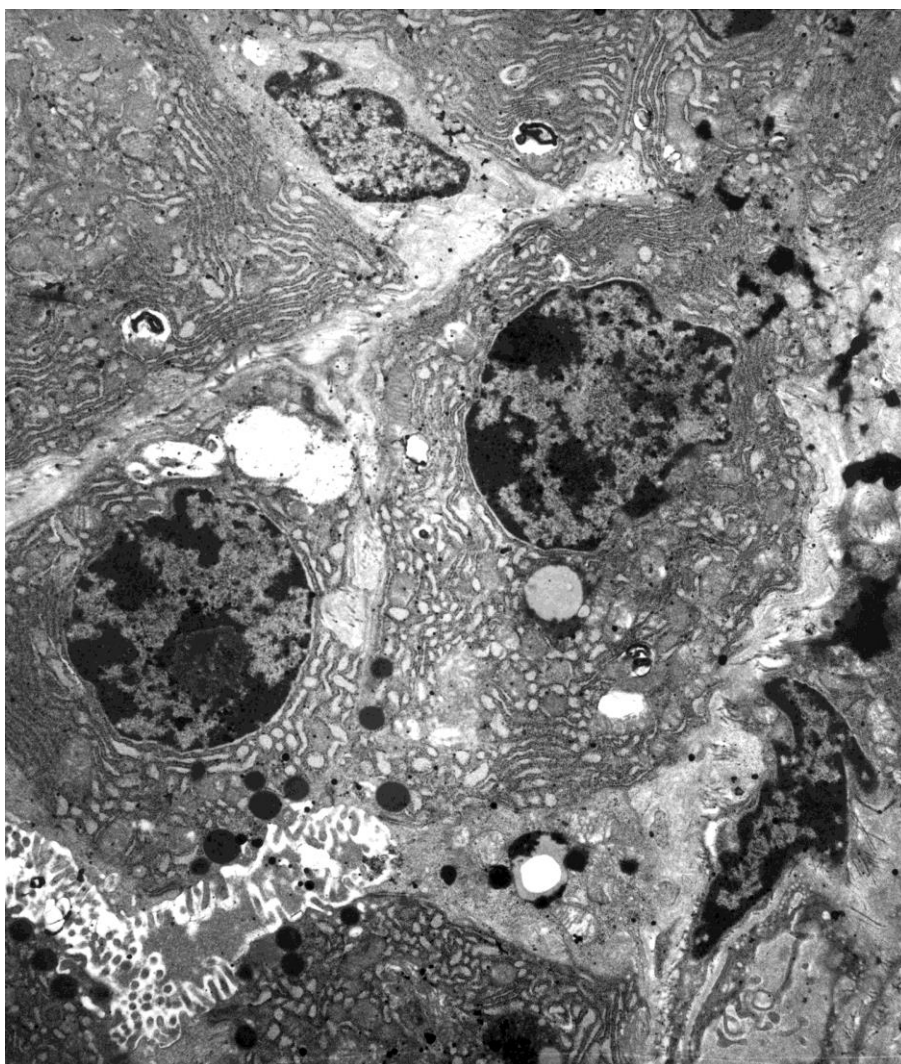
Fig. 21 Pancréas exocrine, cheval n° 10. Présence de vacuoles de taille variables (flèche noire). Gonflement de certaines cellules, noyaux pâles et peu contrastés (flèche blanche). Microscopie optique, hématoxiline-éosine, grossissement 400 X.



2.5.2. Microscopie électronique à transmission

Elle a permis d'observer une ultrastructure pancréatique bien conservée chez les chevaux témoins : réticulum endoplasmique rugueux (RER), mitochondries, granules de zymogène, noyau et nucléole. Le cheval pathologique N° 1 ne montre qu'une légère vacuolisation des organites cellulaires. Le RER est distribué dans l'ensemble de la cellule avec des ribosomes bien attachés à la membrane. Les mitochondries sont intactes avec des crêtes bien visibles. Les granules de zymogène, en nombre réduit, sont localisés au pôle apical de la cellule (Fig. 22).

Fig. 22 Pancréas exocrine, cheval n° 1, pas d'état de choc. L'ultrastructure est bien conservée. Peu de granules de zymogène visibles. Microscopie électronique à transmission, grossissement 4000X.



Par contre, sur les fragments pancréatiques provenant de chevaux qui présentent des signes de choc, en particulier les chevaux N° 9 et 10, le RER est fortement dilaté et rempli d'un

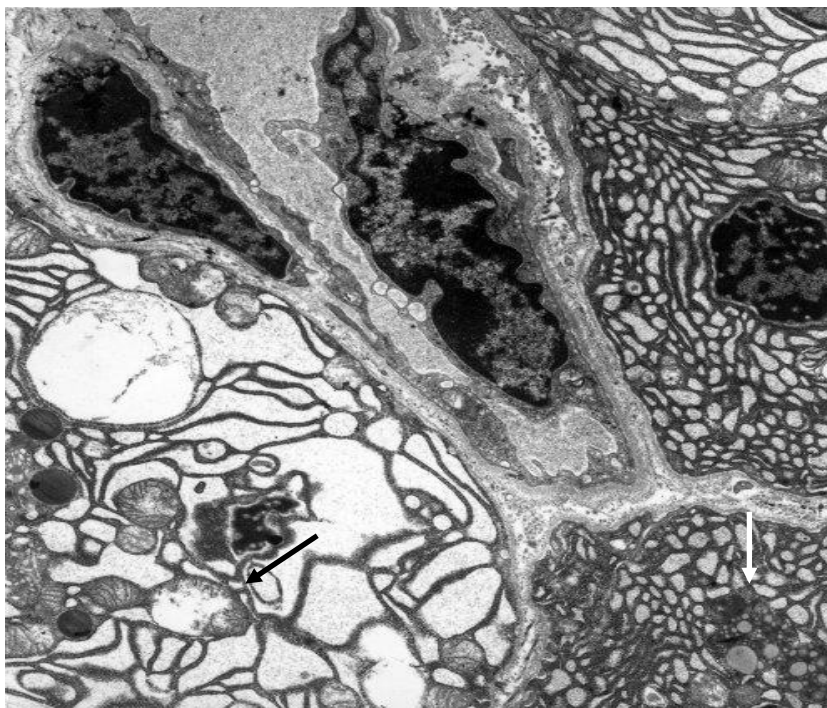
matériel amorphe. Dans certains cas les ribosomes sont bien attachés à la membrane du RER alors que dans d'autres, les citernes dilatées du RER sont remplies de ribosomes libres. Le nombre de granules de zymogène est faible (Fig. 23). Dans certains cas nous constatons une dilatation des mitochondries et une déchirure de leur membrane interne et des crêtes. Ces lésions mitochondriales ne sont pas présentes dans toutes les cellules ni dans toutes les mitochondries d'une même cellule. On note la présence de vacuoles autophagiques sur certaines coupes (Fig. 24).

Fig. 23 Pancréas exocrine, cheval en état de choc sévère. Dilatation importante des citernes du RER remplies d'un contenu amorphe. A certains endroits ribosomes détachés (flèche noire). Dilatation modérée de certaines mitochondries (flèche blanche). Microscopie électronique à transmission, grossissement 4000X.



Fig. 24 Pancréas exocrine, cheval en état de choc sévère. Dilatation de certaines mitochondries avec dissolution de leur membrane interne (flèche noire) et dilatation sévère du réticulum

endoplasmique. Présence de vacuoles autophagiques (flèche blanche). Microscopie électronique à transmission, grossissement 4300X.



2.6. Discussion

Le dosage de la trypsine par une méthode enzymatique permet de mesurer la trypsine qui présente le plus de risque de protéolyse après sa résorption (trypsine libre et liée à l' α_2 -macroglobuline). Les taux normaux de établis sur chevaux témoins sont similaires à ceux observés chez l'homme où une valeur moyenne de TEA de $25,2 \pm 12,8$ ng/mL a été déterminée. Les valeurs chez l'homme varient également largement (de 6 à 81 ng/mL) sans différence significative en fonction du sexe ou de l'âge (Deby-Dupont *et al.*, 1988). En ce qui concerne la trypsine immuno-réactive les valeurs mesurées chez l'homme (26 ng/mL) (Geokas *et al.*, 1979) sont similaires aux taux du cheval sain de notre étude ($30 \pm 6,84$ ng/mL). La présence de la trypsine au niveau de la circulation générale est attribuée à une résorption intestinale (Liebow et Rothman, 1975; Diamond, 1978) variant en fonction du statut digestif (Florholmen *et al.*, 1984). Nos résultats ont montré des taux plasmatiques

anormalement élevés de trypsine (TEA) en cas d'obstruction intestinale. Ce sont les chevaux en état de choc sévère et ceux souffrant d'une obstruction de l'intestin grêle qui présentent l'augmentation la plus significative. En période post-opératoire une augmentation significative survient également. Le dosage par la méthode du RIA selon les techniques décrites antérieurement pour la trypsine humaine (Temler et Felber, 1976 ; Malvano *et al.*, 1980) permet de détecter le trypsinogène et la trypsine liée à l' α_1 -protéinase inhibiteur (Brodrick *et al.*, 1979) et représente donc une méthode complémentaire au dosage enzymatique.

Nos résultats préliminaires montrent également une augmentation significative de la TIR dans certains cas d'obstructions étranglées de l'intestin grêle et du gros intestin.

Des études chez l'homme et l'animal ont montré que la défaillance rénale n'induit pas, dans une durée de temps comparable à celle de nos études des taux aussi élevés en trypsine (Koop, 1984). En outre, plusieurs chevaux en phase post-opératoire ont présenté des taux élevés en trypsine sans toutefois avoir une augmentation de l'urée ou la créatinine. Chez nos chevaux l'intestin grêle en souffrance vasculaire pourrait être à la base des augmentations de TEA plasmatique observées. Le gros intestin en souffrance vasculaire semble être peu probable pour la résorption de la trypsine car les enzymes pancréatiques pourraient être dégradées pendant le passage dans l'intestin grêle (Moore *et al.*, 1995). Comme des obstructions du gros intestin et aussi des obstructions non étranglées en absence de souffrance vasculaire intestinale présentent une augmentation de la trypsine plasmatique, une lésion pancréatique peut être soupçonnée.

Comme il y a peu d'études sur l'histologie du pancréas équin, nous nous sommes heurtés au manque de documentation pour le tissu pancréatique normal. Etant donné que le prélèvement a été réalisé sous anesthésie générale avec la fixation immédiate des fragments, une autolyse due au contenu en enzymes hydrolytiques peut être écartée. Les observations histologiques montrent des lésions de souffrance pancréatique et en particulier au niveau de l'ultrastructure. Nos observations sont similaires à celles obtenues pour le pancréas humain de patients en état de choc sévère. Le pancréas pourrait être particulièrement sensible par son tissu exocrine hautement actif. Cette haute sensibilité du pancréas au choc est reconnue chez l'homme et pour d'autres espèces (Warshaw et O'Hara, 1978 ; Florholmen *et al.*, 1985 ; Lamy *et al.*, 1987 ; Gullo *et al.*, 1996). Le fait que les lésions pancréatiques sont liées à une augmentation de la TEA et TIR au niveau de la circulation générale plaide pour l'existence d'une souffrance pancréatique chez le cheval en état de choc. Celle-ci peut contribuer au développement de

complications tels que la péritonite, l'iléus paralytique ou la défaillance multisystémique, comme démontrée en médecine humaine. Des études d'autres organes comme le foie, les reins ou les poumons devraient dès lors être réalisées dans le but de vérifier si les lésions consécutives au choc et à l'ischémie locale atteignent d'autres organes.

L'implication des enzymes pancréatiques dans le développement du choc et la défaillance multisystémique est démontrée de plus en plus clairement en médecine humaine. Divers travaux ont déjà montré depuis plusieurs années la capacité de la trypsine à activer le complément et par là, les leucocytes (Lasson et Ohlsson, 1982 ; Roxwall *et al.*, 1991). Lefer et collaborateurs ont isolé un peptide plasmatique, le facteur dépresseur du myocarde (MDF), chez l'homme et des chiens en état de choc sévère (Lovett *et al.*, 1971 ; Greene *et al.*, 1977). La formation de ce facteur semble induite par des enzymes pancréatiques (Lefer et Barenholz, 1972). Des travaux récents ont clairement montré que la formation de facteurs activateurs des leucocytes et des cellules endothéliales est induite par des enzymes pancréatiques (Kistler *et al.*, 2000). La formation des facteurs activateurs serait induite au niveau de l'intestin même par les enzymes pancréatiques qui entrent en contact trop étroit avec les entérocytes lors de lésion d'ischémie intestinale. L'application d'inhibiteurs des enzymes pancréatiques au niveau de la lumière intestinale réduit fortement la formation des facteurs activateurs. Ces facteurs seraient de très petite taille (± 3000 Da) mais leur nature n'est pas complètement élucidée (Schmid-Schonbein *et al.*, 2001a et b).

Les enzymes pancréatiques semblent donc jouer un rôle important dans l'activation leucocytaire. Leur concentration plus importante au niveau de l'intestin grêle, pourrait être une cause de l'incidence accrue des complications après les interventions pour des affections de l'intestin grêle. D'autres investigations dans ce domaine seraient souhaitables en médecine équine.

C. DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Discussion générale

Les résultats originaux mis en évidence dans ce travail ont été présentés en deux parties : l'une basée sur des données cliniques, l'autre sur une approche plus fondamentale biochimique et anatomo-pathologique.

Les données cliniques nous ont permis de définir un indice de gravité basé sur l'intensité des symptômes observés lors de l'évaluation préopératoire chez des chevaux souffrant d'obstruction intestinale. Cet indice de gravité permet de poser un pronostic avec une fiabilité comparable à celle basée sur l'indice de choc et de comparer les cas entre eux. Il persiste cependant une certaine subjectivité provenant de l'appréciation que porte le clinicien sur les symptômes lors de l'évaluation préopératoire et lors de l'apparition de complications. Au cours de l'étude clinique rétrospective de l'incidence des pathologies rencontrées dans notre région, nous avons observé un nombre élevé d'incarcération au niveau du foramen épiploïque. En ce qui concerne les complications postopératoires et le temps de récupération, nous avons observé qu'ils dépendent de la présence et de l'importance d'un état de choc préopératoire. Ces observations illustrent l'importance d'un diagnostic précoce et de l'instauration rapide d'un traitement adapté. Remarquons toutefois qu'au cours de cette approche clinique les traitements ont évolué en fonction de nouvelles alternatives thérapeutiques. D'autres facteurs comme la qualité de l'anesthésie et de la chirurgie n'ont pas été pris en compte et pourraient très probablement influencer l'évolution postopératoire. Insistons enfin pour rappeler que dans ce type d'études, il est impossible d'instaurer des lots témoins ou des traitements « placebo » puisque tous les moyens doivent être mis en œuvre pour sauver le cheval.

Au cours de la partie biochimique de ce travail, nous nous sommes d'abord intéressés à l'activation des neutrophiles lors d'obstructions intestinales en utilisant la libération de la myéloperoxydase dans le milieu extracellulaire comme marqueur de cette activation. Cette enzyme est intracellulaire et spécifique des neutrophiles. Dans ce but, la myéloperoxydase équine a été purifiée afin de mettre au point un dosage radio-immunologique. Après avoir défini les valeurs physiologiques, ainsi que l'effet d'un transport ou d'une chirurgie bénigne sur celles-ci, nous avons constaté une augmentation significative de la concentration plasmatique de

myéloperoxydase chez les chevaux atteints d'obstructions intestinales et surtout lors d'étranglement ou d'état de choc. Dans la circulation générale, l'enzyme est inactivée par l'albumine. Par contre lorsqu'elle est libérée par des neutrophiles activés adhérents aux cellules endothéliales ou infiltrés dans les tissus, elle peut exercer pleinement ces effets cytotoxiques notamment par la production d'acide hypochloreux qui est reconnu comme un des plus puissants agents oxydants produits *in vivo* (Pullar *et al.*, 2000). Lors de leur activation les neutrophiles libèrent, outre la myéloperoxydase, d'autres enzymes comme des protéases et des médiateurs pro-inflammatoires tels que des prostanoïdes, des leucotriènes et des cytokines. Il serait intéressant de prolonger ce travail en mettant notamment en relation le taux de myéloperoxydase circulante et le taux de survie.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude biochimique et anatomo-pathologique du pancréas. En effet, en médecine humaine, il est unanimement reconnu que l'état de choc entraîne une ischémie splanchnique et le pancréas est un organe particulièrement sensible à l'ischémie. Etant donné l'absence de travaux sur le pancréas équin, nous avons dû mettre au point des dosages de la trypsine enzymatiquement active et immuno-réactive dans le plasma. Lors d'obstruction intestinale, nous avons observé une augmentation significative du taux plasmatique de trypsine enzymatiquement active. Celui-ci augmente surtout lors d'état de choc sévère et dans les cas d'obstruction de l'intestin grêle ainsi qu'en période post-opératoire et surtout lors de complications graves. La résorption de la trypsine par la paroi intestinale grêle nécrosée ne peut expliquer seule ces observations. En effet, nous avons observé des taux plasmatiques élevés de trypsine chez des chevaux souffrant d'obstruction non étranglée du gros intestin. C'est ainsi que l'existence d'une souffrance pancréatique a été suspectée. Afin de préciser ce point, des prélèvements de tissus pancréatiques ont été réalisés chez des chevaux souffrant d'obstruction intestinales étranglées et/ou de choc irréversibles. La microscopie optique et électronique a permis de mettre en évidence des lésions de dégénérescence vacuolaire.

A ce jour, aucun élément de médecine équine ne nous permet d'établir une liaison indiscutable entre les observations majeures de ce travail c'est-à-dire entre l'activation des neutrophiles, la présence de taux élevés de trypsine plasmatique et les lésions du pancréas. Toutefois des travaux récents en médecine humaine montrent que les enzymes pancréatiques sont capables d'activer les leucocytes et que le traitement par des antiprotéases prévient cette activation (Lundberg *et al.*, 2000 ; Kistler *et al.*, 2000). Les protéases pancréatiques

provoqueraient la formation de substances à faible poids moléculaire capables d'activer diverses cellules au niveau de la micro-circulation ce qui entraîne une inflammation généralisée et une défaillance multisystémique (Mitsuoka *et al.*, 2000 ; Schmid-Schönbein *et al.*, 2001a et b). Des mécanismes similaires pourraient être envisagés chez le cheval.

2. Conclusions et perspectives

Les résultats originaux présentés dans ce travail apportent des éléments neufs dans l'approche clinique des obstructions intestinales et dans la compréhension de la physiopathologie des coliques du cheval. C'est ainsi que, sur base des paramètres cliniques récoltés lors de l'examen préopératoire, il est possible d'établir une gradation de la gravité des cas et surtout d'établir un pronostic. Nous démontrons en outre, l'implication de l'activation des neutrophiles dans le développement du choc, la présence de taux plasmatiques élevés de trypsine et l'apparition de lésions pancréatiques dans des cas particulièrement graves de choc endotoxique lors de lésions intestinales sévères. La trypsine est une enzyme clef du pancréas et possède des effets systémiques très divers. Elle peut contribuer à perpétuer la cascade inflammatoire via ses effets d'activation du complément et des leucocytes. Elle intervient également comme facteur procoagulant dans la coagulation. A ce jour le pancréas est un organe très peu étudié chez le cheval, alors que nos résultats semblent indiquer qu'il pourrait jouer un rôle non négligeable dans la physiopathologie de l'obstruction intestinale et du choc endotoxique équin. De nombreuses perspectives de recherches s'ouvrent ainsi dans ce domaine.

D. BIBLIOGRAPHIE

BAKER R.H. Acute necrotizing pancreatitis in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1978, **172**, 268-270.

BAKKENIST A.R.J., WEVER R., VULSMA T., PLAT H., VAN GELDER B.F. Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **524**, 45-54.

BENBAREK H., DEBY-DUPONT G., CAUDRON I., DEBY C., LAMY M., SERTEYN, D. Failure of lipopolysaccharides to directly trigger the chemiluminescence response of the isolated equine polymorphonuclear leucocytes. *Vet. Res. Com.*, 1997, **21**, 477-482.

BENBAREK H, DEBY-DUPONT G, CAUDRON I, GRULKE S, DEBY C, LAMY M, SERTEYN D. Interactions between lipopolysaccharides and blood factors on the stimulation of equine polymorphonuclear neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **64**, 313-322.

BENBAREK H., GRULKE S., DEBY-DUPONT G., DEBY C., MATHY-HARTERT M., CAUDRON I., DESSY-DOIZE C., LAMY M., SERTEYN D. Cytotoxicity of stimulated equine neutrophils on equine endothelial cells in culture. *Equine Vet. J.*, 2000, **32**, 327-333.

BOCHSLER P.N., SLAUSON D.O., NEILSEN N.R. Secretory activity of equine polymorphonuclear leukocytes: stimulus specificity and priming effects of bacterial lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1992, **31**, 241-253.

BREIDER M.A., KIELY R.G., EDWARDS J.F. Chronic eosinophilic pancreatitis and ulcerative colitis in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1985, **186**, 809-811.

BRODRICK J.W., LARGMAN C., JOHNSON J.H., GEOKAS M.C. Human cationic trypsinogen. *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, 2732-2736.

BRODRICK J.W., GEOKAS M.C., LARGMAN C., FASSETT M., JOHNSON J.H. Molecular forms of immunoreactive pancreatic cationic trypsin in pancreatitis patient sera. *Am. J. Physiol.*, 1979, **237**, E474-E480.

CAUDRON I., GRULKE S., MIESEN M., BENBAREK H., SERTEYN D. Choix d'un traitement lors d'accrochement du côlon au niveau du ligament néphro-splénique chez le cheval : laparotomie ou réduction non chirurgicale. *Ann. Méd. Vét.*, 1996, **140**, 357-362.

CULLMANN W., DICK W. A chromogenic assay for evaluation of α_2 -macroglobulin level in serum and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1981, **19**, 287-290.

DEBY-DUPONT G., REYNAERT M., LAMY M., FRANCHIMONT P. Justification biochimique du drainage du canal thoracique au cours de la pancréatite nécrotique hémorragique. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 1988, **L1**, 31-40.

DIAMOND J.M. Reabsorption of digestive enzymes: playing with poison. *Nature*, 1978, **271**, 112-112.

FAYMONVILLE M.E., PINCEMAIL J., DUCHATEAU J., PAULUS J.M., ADAM A., DEBY-DUPONT G., DEBY C., ALBERT A., LARBUISSON R., LIMET R., LAMY M. Myeloperoxidase and elastase as markers of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1991, **102**, 309-317.

FLORHOLMEN J., BURHOL P.G., JORDE R. Postprandial response and diurnal variation of serum cationic trypsin-like immunoreactivity in man. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1984, **19**, 622-625.

FLORHOLMEN J., REVHAUG A., BURHOL P.G., LUNDGREN T.I., GIERCKSKY K.E. Effect of hemorrhagic and nortriptyline-induced shock on the porcine pancreas as evaluated by changes in serum cationic trypsin-like immunoreactivity. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1985, **20**, 720-726.

FLORHOLMEN J., LINDAL S., ROKKE O., OLSEN R., BURHOL P.G., REVHAUG A. Effects of endotoxin on the pancreatic ultrastructure. *APMIS*, 1988, **96**, 991-996.

GANGL M., GRULKE S., DETILLEUX J., CAUDRON I., SERTEYN D. Clinical evaluation of a midazolam-ketamine combination as induction method prior to isoflurane anaesthesia in horses. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 147-151.

GEOKAS M.C., LARGMAN C., BRODRICK J.W., JOHNSON J.H. Determination of human pancreatic cationic trypsinogen in serum by radioimmunoassay. *Am. J. Physiol.*, 1979, **236**, E77-E83.

GMAZ-NIKULIN E., NIKULIN A., PLAMENAC P., HEGEWALD G., GAON D. Pancreatic lesions in shock and their significance. *J. Pathol.*, 1981, **135**, 223-236.

GREENE L.J., SHAPANKA R., GLENN T.M., LEFER A.M. Isolation of myocardial depressant factor from plasma of dogs in hemorrhagic shock. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **491**, 275-285.

GREENWOOD F.C., HUNTER W., GLOVER J. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone in high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 1963, **89**, 114-123.

GULLO L., CAVICCHIL., TOMASSETTI P., SPAGNOLO C., FREYRIE A., D'ADDATO M. Effects of ischemia on the human pancreas. *Gastroenterol.*, 1996, **111**, 1033-1038.

HAGER L.P., MORRIS D.R., BROWN F.S., EBERWEIN H. Chloroperoxidase utilisation of halogen anions. *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 1769-1777.

HAMIR A.N. Verminous pancreatitis in a horse. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 301-302.

HEGEWALD G., NIKULIN A., GMAZ-NIKULIN E., PLAMENAC P., BÄRENWALD G. Ultrastructural changes of the human pancreas in acute shock. *Pathol. Res. Pract.*, 1985, **179**, 610-615.

ISHII H., ISHIBASHI M., TAKAYAMA M., NISHIDA T., YOSHIDA M. The role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in neutrophil-mediated remote lung injury after intestinal ischaemia/reperfusion in rats. *Respirology*, 2000, **5**, 325-331.

JONES R.T., GARCIA J.H., MERGNER W.J., PENDERGRASS R.E., VALIGORSKY J.M., TRUMP B.F. Effects of shock on the pancreatic acinar cell. *Arch. Pathol.*, 1975, **99**, 34-644.

KING C.C., JEFFERSON M.M., THOMAS E.L. Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1997, **61**, 293-302.

KISTLER E.B., LEFER A.M., HUGLI T.E., SCHMID-SCHONBEIN G.W. Plasma activation during splanchnic arterial occlusion shock. *Shock*, 2000, **14**, 30-34.

KLEBANOFF S.J. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 1999, **111**, 383-389.

KOOP H. Serum levels of pancreatic enzymes and their clinical significance. *Clin. Gastroenterol.*, 1984, **13**, 739-761.

LAMY M., FAYMONVILLE M.E., DEBY-DUPONT G. Shock pancreas : A new entity? In: Vincent J.L. (Ed.), Update in intensive care and emergency medicine. Springer Verlag : Berlin, 1987, 148-154.

LARRICK J.W., KUNKEL S.L. The role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the immunoinflammatory response. *Pharmaceut. Res.*, 1988, **5**, 129-139.

LASSON A., OHLSSON K. An in vitro study of the influence of plasma protease inhibitors and aprotinin on trypsin-induced C3 cleavage in human serum. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **709**, 227-233.

LEFER A.M., BARENHOLZ Y. Pancreatic hydrolases and the formation of a myocardial depressant factor in shock. *Am. J. Physiol.*, 1972, **223**, 1103-1109.

LIEBOW C., ROTHMAN S.S. Enteropancreatic circulation of digestive enzymes. *Science*, 1975, **189**, 472-474.

LILLEY C.W., BEEMAN G.M. Gastric dilatation associated with acute necrotizing pancreatitis. *Equine Pract.*, 1981, **3**, 8-15.

LOTTENBERG R., HALL J.A., BLINDER M., BINDER E.P., JACKSON C.M. The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **742**, 539-557.

LOVETT W.L., WANGENSTEEN S.L., GLENN T.M., LEFER A.M. Presence of a myocardial depressant factor in patients in circulatory shock. *Surgery*, 1971, **70**, 223-231.

LUNDBERG A.H., EUBANKS J.W.^{3rd}, HENRY J., SABEK O., KOTB M., GABER L., NORBY-TEGLUND A., GABER A.O. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas*, 2000, **21**, 41-51.

MALVANO R., MARCHISIO M., MASSAGLIA A., GIACOSA P.A., ZANNINO M., ANDRIULLI A., BURLINA A. Radioimmunoassay of trypsin-like substance in human serum. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1980, **15** : Suppl 62, 2-10.

MATHESON N.R., WONG P.S., TRAVIS J. Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. *Biochem.*, 1981, **20**, 325-330.

MATHY-HARTERT M., DEBY-DUPONT G., MELIN P., LAMY M., DEBY C. Bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* is acquired by cultured human monocyte-derived macrophages after uptake of myeloperoxidase. *Experientia*, 1996, **52**, 167-174.

McCONNICO R.S., WEINSTOCK D., POSTON M.E., ROBERTS M.C. Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1999, **60**, 807-813.

MITSUOKA H., KISTLER E.B., SCHMID-SCHONBEIN G.W. Generation of in vivo activating factors in the ischemic intestine by pancreatic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 1772-1777.

MOORE J.N., WHITE N.A., BERG J.N., TRIM C.M., GARNER H.E. Endotoxemia following experimental intestinal strangulation obstruction in ponies. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, **45**, 330-332.

MOORE R.M., MUIR W.W., GRANGER D.N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions : A review and its implications in the horse. *J. Vet. Int. Med.*, 1995, **9**, 115-132.

MORRIS D.D. Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J. Vet. Int. Med.*, 1991, **5**, 167-181.

MORRIS D.D., MOORE J.N., CROWE N. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic attributable to gastrointestinal tract disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 1565-1569.

NUIJENS J.H., ABBINK J.J., WACHTVOGEL Y.T., COLMAN R.W., EERENBERG A.J., DORS D., KAMP A.J., STRACK VAN SCHIJNDEL R.J., THIJS L.G., HACK C.E. Plasma élastase alpha 1-antitrypsin and lactoferrin in sepsis: evidence for neutrophils as mediators in fatal sepsis. *J. Lab. Clin. Med.*, 1992, **119**, 159-168.

PARRY B.W., CRISMAN M.V. Serum and peritoneal fluid amylase and lipase reference values in horses. *Equine Vet. J.*, 1991, **23**, 390-391.

PULLAR J.M., VISSERS M.C., WINTERBOURN C.C. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. *IUBMB Life*, 2000, **50**, 259-266.

ROXWALL L., BENGTSON A., SENNERBY L., HEIDEMANN M. Activation of the complement cascade by trypsin. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 1991, **372**, 273-278.

SCHMID-SCHONBEIN G.W., KISTLER E.B., HUGLI T.E. Mechanisms for cell activation and its consequences for biorheology and microcirculation: Multi-organ failure in shock. *Biorheology*, 2001a, **38**, 185-201.

SCHMID-SCHONBEIN G.W., HUGLI T.E., KISTLER E.B., SOFIANOS A., MITSUOKA H. Pancreatic enzymes and microvascular cell activation in multiorgan failure. *Microcirculation*, 2001b, **8**, 5-14.

SEETHANATHAN P., BOTTOMS G.D., SCHAFER K. Characterization of release of tumor necrosis factor, interleukin-1, and superoxide anion from equine white blood cells in response to endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 1221-1225.

SERTEYN D., CAUDRON I., SZOKE M., FONTAINE G., STACQUEZ S., CHEVE D. Diagnostic et pronostic des pathologies intestinales aiguës chirurgicales du cheval. *Prat. Vét. Equine*, 1994, **26**, **2**, 135-145.

SHAPIRA L., CHAMPAGNE C., GORDON B., AMAR S., VAN DYKE T.E. Lipopolysaccharide priming of superoxide release by human neutrophils : role of membrane CD14 and serum LPS binding protein. *Inflammation*, 1995, **19**, 289-295.

SVENDSEN L., BLOMBACK B., BLOMBACK M., OLSSON P.I. Substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes. *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.*, 1972, **98**, 446-454.

TEMLER R.S., FELBER J.P. Radioimmunoassay of human plasma trypsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **445**, 720-728.

TRAVIS J., ROBERTS R.C. Human trypsin. Isolation and physical-chemical characterization. *Biochemistry*, 1969, **8**, 2884-2889.

TRIBL B., MADL C., MAZAL P.R., SCHNEIDER B., SPITZAUER S., VOGELSANG H., GANGL A. Exocrine pancreatic function in critically ill patients : Septic shock versus non-septic patients. *Crit. Care Med.*, 2000, **28**, 1393-1398.

ULEVITCH R.J., TOBIAS P.S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, **13**, 437-457.

VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T. A method for producing antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, **33**, 988-991.

WARSHAW A.L., O'HARA P.J. Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann. Surg.*, 1978, **188**, 197-201.

YAO Y.M., REDL H., BAHRAMI S., SCHLAG G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm. Res.*, 1998, **47**, 201-210.

YARBROUGH T.B., SNYDER J.R., HARMON F.A., O'CONNELL K.A. Evaluation of myeloperoxidase concentrations in experimentally induced equine colonic ischemia and reperfusion. *Equine Vet. J.*, 1994, **26**, 67-69.

Troisième partie

PRESENTATION SYSTEMATIQUE DES ETUDES

DETERMINATION OF A GRAVITY AND A SHOCK SCORE FOR THE PROGNOSIS IN EQUINE SURGICAL COLIC.

S. Grulke¹, E. Olle¹, J. Detilleux², M. Gangl¹, I. Caudron¹ and D. Serteyn¹.

1 Department of General Anaesthesia and Large Animal Surgery B 41.

2 Quantitative Genetics and Statistics B 43.

Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium.

Journal of Veterinary Medicine A, 2001, **48**, 465-473.

Summary

A retrospective study evaluated 200 surgical colic cases. A gravity score (GS) based on four clinical parameters estimating intestinal obstruction (rectal palpation, borborygmi, abdominal distension, pain) and classified in three categories was established and tested to determine if it could evaluate prognosis. A shock score (SS) based on six parameters was also attributed to each case. Overall survival rate was 54%. The statistical analysis showed significant ($P < 0.01$) difference of the survival rate in the different categories of GS as well as in the categories of SS. A multivariate logistic regression model showed that horses with GS 3 are 10.6 times more likely to die than those with GS 1. A model combining the two scores showed an odds ratio of 7.1 for GS 3 versus GS 1, and for SS 3 versus SS 1, the odds ratio was 7.2.

With 5 tables and 4 figures.

Introduction

Acute abdominal disease (colic) is the major cause of morbidity and mortality in the horse (Cohen et al., 1995). Prospective studies of equine colic point out incidences of 10 colic cases per 100 horse-years in a study of Tinker (1997) and even 26 cases in another study of Uhlinger (1992). The proportion of mortality due to colic is greater than the proportion of any other cause of death including old age and injury (Tinker et al., 1997).

Surgical colic cases, especially, present poor survival rates, from only 34 % (McCarthy and Hutchins, 1988) or 35 % (Ebert, 1994a) to 53.6% (Shires et al., 1986) and 56% (Parry et al., 1983c) up to 69.7 % (Puotunen-Reinert and Huskamp, 1985). Several authors also agree that small intestine lesions have poorer outcome because of the high percentage of strangulated lesions compared with large intestine obstructions (Parry, 1983; Pascoe et al., 1983; McCarthy and Hutchins, 1988; Ebert, 1994a).

Due to high costs of surgery and intensive care, one easily understands the importance of giving a prognosis for the colicky horse. It is difficult to specify because of the multiple factors to consider, including the type and severity of the primary lesion and the secondary changes complicating it (Huskamp, 1973). Several studies estimate the prognostic value of individual variables used in the assessment of equine colic cases. The best prognostic variables were commonly those estimating the integrity of cardiovascular function (Moore et al., 1976; Gay et al., 1977; Parry et al., 1983a; 1983b; Puotunen-Reinert, 1986; Orsini et al., 1988) but variables estimating the amount and intensity of devitalised bowel by abdominal fluid analysis (Allen et al., 1986; Reeves et al., 1989; Freden et al., 1998) were also prognostically useful. The variables heart rate, packed cell volume, blood lactate concentration and capillary refill time were recognised as significant variables by nearly every author. Other parameters like systolic arterial pressure were highly significant in some studies (Gay et al., 1977; Parry et al., 1983a) but non significant in others (Ebert, 1994b). The results of the studies depend on the number and type of cases. There are only very few studies that validate the results on another population (Reeves et al., 1988; Furr et al., 1995). More and more authors try to define models by logistic regression using several parameters in order to increase the accuracy in predicting the outcome (Puotunen-Reinert, 1986; Reeves et al., 1989; Furr et al., 1995; Ebert, 1995).

Only few authors use clinical variables estimating intestinal obstruction or function for prognosis. The variables used were intensity of colic signs (Puotunen-Reinert, 1986; Ebert, 1994b) and the intensity or frequency of abdominal sounds (Kalsbeek, 1975; Stashak, 1979; Reeves et al., 1989; Ebert, 1994b).

We often observe colicky horses which only show slight shock symptoms in spite of severe intestinal lesions. This could be due to treatment with strong anti-inflammatory drugs or due to the only ischemia period before reperfusion at the time of reception of the horse. We often remark that severe shock symptoms appear at the time of reperfusion after repositioning during surgery. So we wondered if other means than shock symptoms could be able to evaluate the prognosis at the time of arrival of the horse at the clinic. The aim of this study was to define clinical parameters estimating intestinal obstruction which could be beneficial for prognosis.

Material and Methods

Data was collected on 200 surgical colic cases referred to our clinic during the last four years (only cases with sufficient data and with precise diagnosis were retained, cases euthanized for economic reasons were eliminated from the study). The ages ranged from 4 months to 25 years with a mean of 9 years. The population was composed of 98 mares, 72 geldings and 30 stallions. The breeds were essentially (151) Warmbloods but also 16 Ponies, 9 Trotters, 6 Thoroughbreds, 5 Pintos, 4 Arabs, 4 draft horses, 2 Anglo-Arabs, 2 Appaloosas and 1 Andalousian. Horses weighed from 75 to 850 kg with an average of 516 kg.

On arrival, the same protocol for acute abdominal emergency reception was applied to each horse by the same staff including history of colic signs, clinical evaluation, rectal palpation, gastric intubation, paracentesis, systolic arterial pressure measurements, hematologic and biochemical blood tests. A gravity score (GS) and shock score (SS) were attributed to each case.

The GS was based on four parameters estimating intestinal obstruction (mechanical obstruction {by impaction, displacement, incarceration, torsion} of intestinal lumen not permitting normal function), which are currently used to distinguish the medical and the surgical character of colic. These parameters were rectal palpation, frequency of borborygmi, abdominal distension and severity of pain and they were classified in 3 categories. The highest value of any one of the 4 parameters attributed the note for the final GS. For category 1, rectal exploration is possible, there is only local and mild distension of bowel, borborygmi are normal, there is no external abdominal distension and pain is absent or low and responding to slight analgesic (p. ex. Dipyrone). For category 2, rectal exploration is more difficult, bowel is distended in one side of the abdomen, borborygmi are diminished at least in one flank, abdominal distension and pain are moderate, but pain is still responding to treatment of stronger analgesics like flunixin méglumine. In category 3, rectal exploration is impossible, there is severe distension, borborygmi are absent, abdomen is highly distended and pain is severe and continuous (only responding for a short time (or even not) to strong analgesics like alpha 2 agonists and butorphanol) or the horse is already depressed (see table 1). As all the horses presented to the clinic have had anterior treatment by referring veterinarian, pain was categorised with consideration of the administered treatment.

Table 1. Determination of the 3 categories of Gravity Score.

	1	2	3
Rectal palpation	exploration possible, local mild distension	exploration partially impossible, distension	exploration impossible, severe distension
Borborygmi	normal	diminished, one flank	absent
Abdominal distension	no	mild, one flank	high
Severity of pain	absent, low	mild	severe, depression

For each category of GS the time elapsed between the onset of colic and the referral were recorded and compared by a non-parametric test and significance was observed when estimate of p-value < 0.05.

A SS was also attributed to each case and is composed of six cardiovascular parameters classified in four categories (absent, mild, severe, irreversible). These parameters were heart rate, respiratory rate, systolic arterial pressure, packed cell volume, blood lactate concentration and blood urea nitrogen. It was also the highest value attributed to a case that determined the shock score and if certain values were not available then the index was obtained using the others (see table 2 for precise values of the categories).

Table 2. Determination of the 4 categories of Shock Score.

	1	2	3	4
Heart rate (bpm)	< 60	60 - 80	80 - 100	> 100
Respiratory rate (bpm)	< 25	25 - 35	35 - 45	> 45
Packed cell volume (%)	< 45	45 - 55	55 - 65	> 65
Systolic art. press. (mmHg)	> 110	90 - 110	70 - 90	< 70
Blood lactate conc. (mg/dl)	< 75	< 75	75 - 100	> 100
Blood urea nitrog. (mg/dl)	< 40	40 - 55	55 - 70	> 70

bpm : beats per minute ; art. press. : arterial pressure ; conc. : concentration ; nitrog. : nitrogen

Main types of lesions observed in surgery were also listed.

Survival rate prevalence (number of surviving horses over total number of horses) was computed for each colic localisation (small or large intestine), for each category and each component of the gravity score, and for shock score. The null hypothesis of identical survival rate in each category of the two scores was tested with chi-square tests. Heart rate and packed cell volume were averaged for dead and survived horses separately.

A multivariate logistic regression model was used to determine possible relationships between survival rate on the one hand and colic localisation (large or small intestine), shock score (1 to 3), gravity score (1 to 3), HR, and PCV on the other hand. In order to find the most parsimonious model that best fit the data, a stepwise procedure was used (logistic procedure by SAS). The fit of each successive model was evaluated by the deviance and the Aitken Information Criteria. Odds of dying are defined as the probability of dying divided by the probability of surviving for horses with the same value for one variable under study. The odds ratio is the ratio of odds of dying and odds of surviving. The significance level p for the statistical analysis is $p < 0.01$.

Results

The cases were composed of 101 large intestine obstructions from which 44 were strangulated and 99 small intestine obstructions with 96 strangulated lesions (Table 3).

Table 3. Type of pathology and number of survivors and non-survivors

	Survivors	Non-Survivors	Total
Large intestine strang. obstr.	16	28	44
Large intestine non-strang. obstr.	50	7	57
Small intestine strang. obstr.	40	56	96
Small intestine non-strang. obstr.	2	1	3
Total	108	92	200

strang. obstr. : strangulating obstruction

Overall survival rate was 54 %. Survival rates were significantly different between small (42.4 %) and large intestine (65.3 %). Survival rate of the non strangulating large intestine obstruction was of 87.7%, of the strangulating large intestine obstruction of 36.4 % and for the small intestine strangulating obstruction of 41.7 %. The number of cases and the distribution gives sufficient number of cases for statistical analysis in the different categories of GS and SS for the large and small intestine. Table 4 shows that the number of cases of large and small intestine in the different categories of GS were similar.

Table 4. Localisation of the obstruction for each category of Gravity Score.

	GS 1	GS 2	GS 3	Total
Large intestine	16	52	33	101
Small intestine	14	45	40	99
Total	30	97	73	200

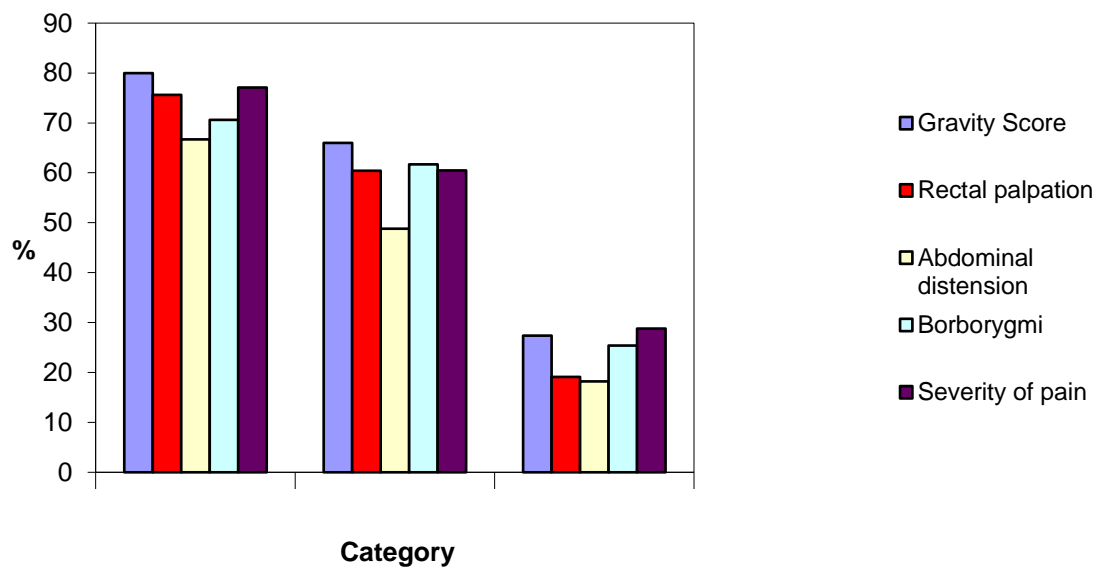
The main lesion types for small intestine were incarceration in epiploic foramen (n = 51), volvulus (n = 20), strangulating inguinal hernia (n = 11), strangulating lipoma (n = 10) and various types (n = 7) and for large intestine we encountered especially left dorsal displacements of left colon (n = 28), right dorsal displacements of left colon (n = 24), torsion or volvulus of ascending colon (n = 32), various lesions of descending colon (n = 9) and others (n = 8).

The time elapsed between the onset of colic signs and the referral was recorded for 180 cases because of non sufficient data for the other cases and 5 horses of GS 2 had onset of more than 3 days and so these values have not been considered. The mean values of colic signs were 10 hours \pm 8 (from 2 to 36, n = 30) for GS 1, 13 hours \pm 9 (from 2 to 48, n = 79) for GS 2 and 14 \pm 10 hours for GS 3 (from 2 to 48, n = 71) and no significant difference was seen. When the data were split up for survivors and non survivors there was only significant difference for GS 3 (10 \pm 7 hours for survivors, n = 20 versus 16 \pm 11 hours for non survivors, n = 51).

The survival rate was significantly different across the categories of gravity score, where the survival rate was of 80 % for GS 1, 66 % for score 2 and 27.3 % for GS 3. The odds of dying were estimated significant and 10.6 times greater in horses with GS 3

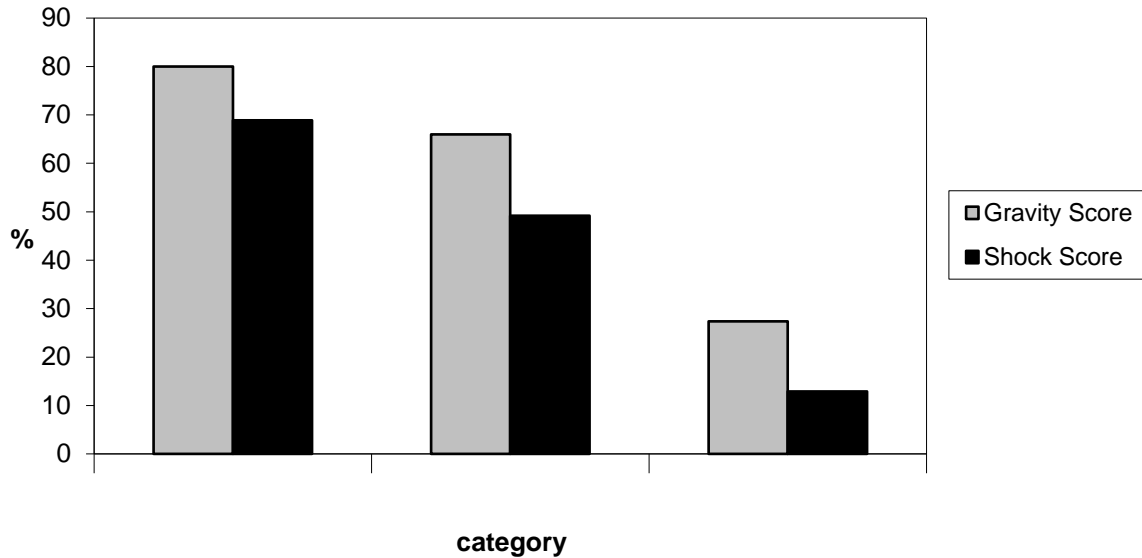
compared to horses with GS 1. For GS 2 the odds ratio was non significant. Furthermore there is a significant relation between the survival rate and the parameters forming the GS, that are rectal palpation, frequency of borborygmi, abdominal distension and severity of pain. Figure 1 shows the significant relation between the survival rate and the parameters of GS. The survival rate for the most frequent problem, incarceration in epiploic foramen was of 89 % for GS 1, 50 % for GS 2 and of 13 % for GS 3.

Fig. 1 Survival rate and the three categories of the gravity score and its components



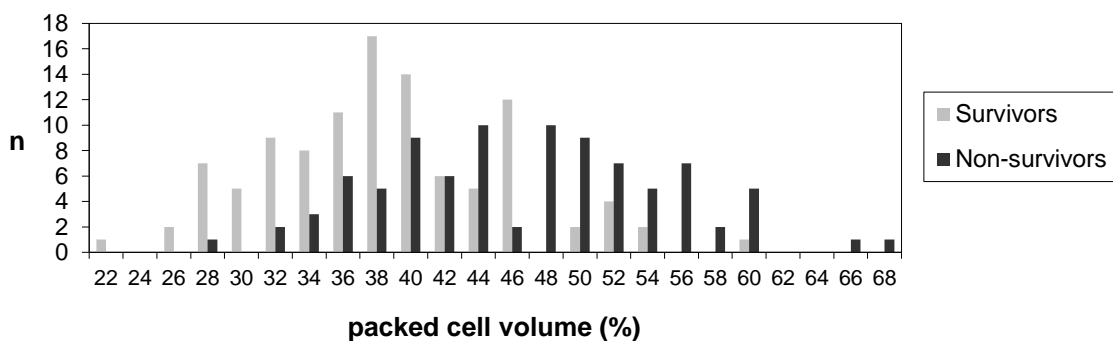
For the SS statistical analysis only considered SS 1 to 3 because of a very small number of horses in the fourth category. They were included in the third category. The survival rate was significantly different between the categories of SS with a survival rate of 68.8 % for SS 1, 49.1 % for SS 2 and 12.9 % for SS 3 (figure 2). The logistic regression model showed odds ratio of dying significant of 10.8 from SS 3 versus SS 1.

Fig. 2 Survival rate in the different categories of the gravity score and the shock score.



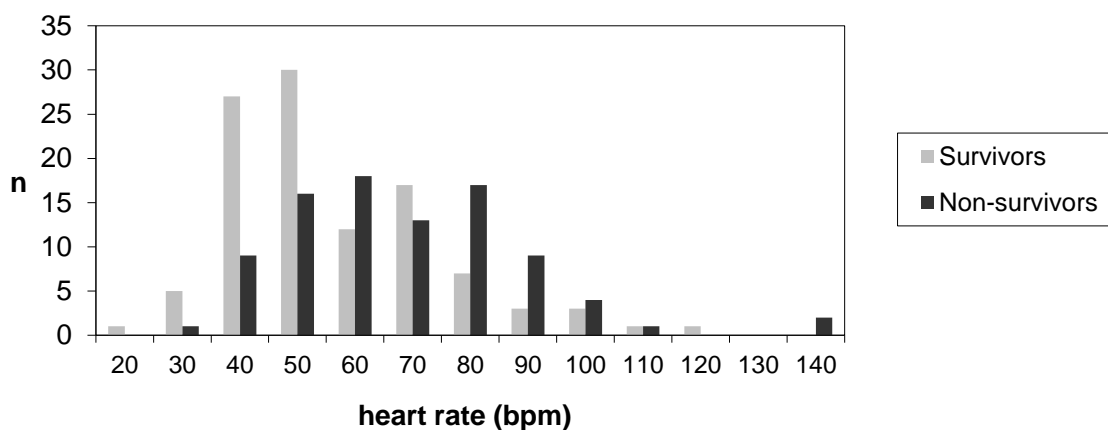
The mean PCV \pm Sd was 39 % (\pm 6) for surviving horses and 47 % (\pm 8) for non-surviving horses. The number of survivors and non-survivors with their corresponding PCV is illustrated on the histogram (figure 3). The logistic regression technique showed that odds of dying increase significantly by 0.5 for an increase of 1 unit of PCV.

Fig. 3 Distribution of packed cell volume between survivors and non-survivors.



The mean HR \pm Sd was 59 (\pm 17) for surviving horses and 71 (\pm 21) for non-survivors. The distribution of HR for survivors and non-survivors is also shown on the histogram (figure 4). Odds of dying is estimated non significant for HR.

Fig. 4 Distribution of heart rate between survivors and non-survivors.



The percentage of horses from each category of SS is significantly different in the categories of GS as illustrated in Table 5, where you can also see the survival rate of the combined scores which diminishes severely when shock symptoms appear in category 3 of GS.

Table 5. Number and percentage of the survivors in the combined Gravity and Shock Scores.

	SS1	SS2	SS3
GS1	22/26 (84.6%)	2/3 (66.7)	0/1 (0)
GS2	39/56 (69.6%)	23/33 (69.7%)	3/8 (37.5%)
GS3	12/24 (50%)	7/27 (25.9%)	0/22 (0%)

The logistic regression technique estimates odds of dying for GS and SS in the same model but only GS 3 and SS 3 are considered significant. Odds ratios are 7.1 for GS 3 and 7.2 for SS 3 versus score 1.

Discussion

Giving a prognosis for surgical colics remains difficult because of the different variables to consider such as time elapsed between onset of colic and referral, previous

treatments, different nature of the problem (part of bowel concerned and extend of damage) and other individual characteristics.

The results of our study show a similar overall survival rate to other studies (Parry, 1983; Pascoe et al., 1983; Shires et al., 1986).

The survival rate is significantly related to the localisation of the pathology because of the high percentage of strangulating obstruction in the small intestine also observed by other authors (Parry, 1983; McCarthy and Hutchins, 1988; Ebert, 1994a). When only strangulating obstructions are considered the survival rate of the small (41.7 %) and large intestine (36.4%) are quite similar in our study. These survival rates are quite low but similar to other studies. Harrison (1988) reported a survival rate of 34.7 % for large intestinal volvulus and Pascoe et al. (1983) reported for small intestine lesions an overall survival rate of 39.3 %.

We found a similar number of cases for large and small intestine in the different categories of GS and the number is sufficient for statistical analysis. In spite of a large variety of pathologies the score can be attributed to every surgical colic case as there is no significant difference between the number of cases of small and large intestine in the different categories of GS. Therefore no separate evaluation of GS has been done for findings of small or large intestine on rectal examination or during surgery. Other studies could be done in order to test the GS on medical colics (large and small colon impaction, large colon meteorismus, anterior enteritis), that could show different results. With a larger number of cases the GS could be evaluated on the different types of pathologies as it has been partially done in another study (Grulke et al. 2000).

The duration of colic signs is used as a value for prognosis, but in a study of Ebert (1994b) longer duration has better prognosis due to the fact that medical and surgical colic cases were evaluated. Another study (Parry et al., 1983) shows shorter duration of colic signs for surviving horses but no significant difference is seen, that could be explained by the fact, that very severe strangulation obstructions already lead to death with a very short duration after the onset of colic.

Our study shows that the GS has a good prognostic value. We think that the GS is directly related to the survival rate because the rectal palpation and the abdominal distension estimate the degree of intestinal obstruction. The distension of bowel is accompanied by higher risks for surgical procedure and anaesthesia as pointed out by Hackett (1983), and is disturbing the microcirculation of the intestinal wall (Allen et al.,

1986; Ebert, 1994a). Particularly the strangulation obstructions result in rapid and severe tympany. Furthermore pain is induced by distension of the bowel and the tension on the mesentery (Allen et al., 1986). Therefore especially horses having strangulating pathologies with poorer prognosis present severe and continuous signs of pain. Diminished or absent borborygmi could create post-surgical ileus, which still remains a major problem as mentioned in a study of Gerring et al. (1991). Even if all the parameters of GS are subjective, they become easy to standardise when classified in three categories. In cases where shock symptoms have not yet occurred because of still lasting ischemia or because of highly effective anti-inflammatory medication the prognosis can be given when clinical obstructive signs are considered. Furthermore the clinical obstructive signs are easily observed without laboratory and already the field veterinary surgeon can better estimate prognosis and react more rapidly before the onset of shock symptoms by referral of the horse to a specialised clinic.

Because of a small number of cases with SS 4, categories 3 and 4 were put together for statistical analysis. As already seen in previous studies shock symptoms are a good prognostic instrument, with severe shock, we observe high mortality. Even if nowadays intensive medical therapy significantly controls shock symptoms they reflect intestinal lesions that may be irreversible or inoperable.

Combining the two scores in the same model diminished the odds ratios and therefore gives only little more precision. This is due to the fact that the two scores are not independent even if they do not measure the same values.

Isolated parameters of shock score like packed cell volume and heart rate were often used for prognosis and also showed significant difference between survivors and non-survivors in the present study. But especially for heart rate the distribution is very wide and not linear and in the logistic regression heart rate was estimated non-significant. This could be explained by the fact that heart rate is influenced by several factors such as pain, excitement (transport, examination at the clinic) causing tachycardia and several drugs like alpha-2 agonists and opioids causing bradycardia. In order to reduce the factors influencing the heart rate it should be recorded several times every ten minutes after the arrival of the horse. The same factors can influence packed cell volume by splenic contraction as already observed in a study by Puotunen-Reinert (1986).

In conclusion, this study shows that the GS based on the clinical parameters is a good means to estimate prognosis. Consequently valuable information could be given to

the horse owner by the field veterinary surgeon even without a laboratory. The shock symptoms remain good prognostic parameters as already shown in other studies. For some cases the prognosis can be more accurately estimated when the two scores are used.

Bibliography

- ALLEN, D., N.A. WHITE, and D.E TYLER , 1986: Factors for prognostic use in equine obstructive small intestinal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **189**, 777-780.
- COHEN, N.D., P.L. MATEJKA, C.M. HONNAS, R.N. HOOPER, and THE TEXAS EQUINE COLIC STUDY GROUP, 1995: Case-control study of the association between various management factors and development of colic in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **206**, 667-673.
- EBERT, R., 1994a: Letalitätsaspekte der Kolik des Pferdes. *Pferdeheilkunde* **10**, 89-93.
- EBERT, R., 1994b: Prognostische Parameter bei der Kolik des Pferdes. *Tierärztl. Prax.* **22**, 256-263.
- EBERT, R., 1995: Differenzierte Prognostik beim Kolikpferd. *Tierärztl. Prax.* **23**, 475-480.
- FREDEN, G.O., P.J. PROVOST, and W.M. RAND, 1998: Reliability of using results of abdominal fluid analysis to determine treatment and predict lesion type and outcome for horses with colic : 218 cases (1991-1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**, 1012-1015.
- FURR, M.O., P. LESSARD, and N.A. WHITE, 1995: Development of a colic severity score for predicting the outcome of equine colic. *Vet. Surg.* **24**, 97-101.
- GAY, C.C., J. CARTER, , M. McCARTHY, T.A. MASON, B.A. CHRISTIE, W.T. REYNOLDS, and B. SMYTH, 1977: The value of arterial blood pressure measurement in assessing the prognosis in equine colic. *Equine Vet. J.* **9**, 202-204.
- GERRING, E.L., J.N. KING, G.B. EDWARDS, H. PEARSON, J.P. WALMSLEY, and T.R.C. GREET, 1991: A multicentre trial of cisapride in the prophylaxis of equine post operative ileus. *Equine Vet. Educ.* **3**, 143-145.
- GRULKE, S., GANGL, M., CAUDRON, I. and D. SERTEYN, 2000: Etude rétrospective de 206 cas de pathologie chirurgicale intestinale chez le cheval: incidence, diagnostic, pronostic et complications. *Ann. Méd. Vét.* **144**, 319-328.
- HACKETT, R.P., 1983: Nonstrangulated colonic displacement in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**, 235-240.
- HARRISON, I.W., 1988: Equine large intestinal volvulus. A review of 124 cases. *Vet. Surg.* **17**, 77-81.
- HUSKAMP, B., 1973: Ileusdiagnose beim Pferd. *Tierärztliche Praxis* **1**, 67-74.
- KALSBEEK, H.C., 1975: Indications for surgical intervention in equine colic. *J. South African Vet. Assoc.* **46**, 101-105.
- McCARTHY, R.N., and D.R. HUTCHINS, 1988: Survival rates and post-operative complications after equine colic surgery. *Austr. Vet. J.* **65**, 40-43.
- MOORE, J.N., R.R. OWEN, and J.H. LUMSDEN, 1976: Clinical evaluation of blood lactate levels in equine colic. *Equine Vet. J.* **8**, 49-54.
- ORSINI, J.A., A.H. ELSER, D.T. GALLIGAN, J.W. DONAWICK, and D.S. KRONFELD, 1988: Prognostic index for acute abdominal crisis (colic) in horses. *Am. J. Vet. Res.* **49**, 1969-1971.

- PARRY, B.W., G.A. ANDERSON, and C.C. GAY, 1983a: Prognosis in equine colic : a comparative study of variables used to assess individual cases. *Equine Vet. J.* **15**, 211-215.
- PARRY, B.W., C.C. GAY, and G.A. ANDERSON, 1983b: Assessment of the necessity for surgical intervention in cases of equine colic : A retrospective study. *Equine Vet. J.* **15**, 216-221.
- PARRY, B.W., G.A. ANDERSON, and C.C. GAY, 1983c: Prognosis in equine colic : A study of individual variables used in case assessment. *Equine Vet. J.* **15**, 337-344.
- PARRY, B.W., 1983: Survey of 79 referral colic cases. *Equine Vet. J.* **15**, 345-348.
- PASCOE, P.J., W.N. McDONNELL, C.M. TRIM, and J. VAN GORDER, 1983: Mortality rates and associated factors in equine colic operations – a retrospective study of 341 operations. *Can. Vet. J.* **24**, 76-85.
- PUOTUNEN-REINERT, A., and B. HUSKAMP, 1985: Möglichkeiten der Prognostik beim chirurgischen Kolikpferd : Untersuchung von 110 Fällen. *Pferdeheilkunde* **1**, 123-129.
- PUOTUNEN-REINERT, A., 1986: Study of variables commonly used in examination of equine colic cases to assess prognostic value. *Equine Vet. J.* **18**, 275-277.
- REEVES, M.J., C.R. CURTIS, M.D. SALMAN, and B.J. HILBERT, 1989: Prognosis in equine colic patients using multivariable analysis. *Can. J. Vet. Res.* **53**, 87-94.
- REEVES, M.J., C.R. CURTIS, M.D. SALMAN, T.S. STASHAK, and J.S. REIF, 1988: Development and validation of multivariable models to predict the need for surgery and prognosis in equine colic patients. *Act. Vet. Scand. (Suppl.)* **84**, 329-332.
- SHIRES, G.M., A.J. KANEPS, P.C. WAGNER, and W.B. SCHMOTZER, 1986: A retrospective review of 219 cases of equine colic. *Equine colic research. Proc. II Symp. University of Georgia* **2**, 239-241.
- STASHAK, T.S., 1979: Clinical evaluation of the equine colic patient. *Vet. Clin. North Am.: Large An. Pract.* **1**, 275-287.
- TINKER, M.K., N.A. WHITE, P. LESSARD, C.D. THATCHER, K.D. PELZER, B. DAVIS, and D.K. CARMEL, 1997: Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet. J.* **29**, 448-453.
- UHLINGER, C., 1992: Investigations into the incidence of field colic. *Equine Vet. J., Suppl.* **13**, 16-18.

**ETUDE RETROSPECTIVE DE 206 CAS DE PATHOLOGIE
CHIRURGICALE INTESTINALE CHEZ LE CHEVAL :
INCIDENCE, DIAGNOSTIC, PRONOSTIC ET
COMPLICATIONS.**

S. GRULKE, M. GANGL, I. CAUDRON, D. SERTEYN

Anesthésiologie générale et pathologie chirurgicale des grands animaux

Bât. B 41

Faculté de Médecine Vétérinaire

4000 Sart-Tilman

Belgique.

Annales de Médecine Vétérinaire, 2000, **144**, 319-328.

Résumé

Cette étude rétrospective porte sur 206 cas référés pour coliques chirurgicales et illustre l'incidence des diverses pathologies rencontrées. L'intestin grêle était atteint dans 106 cas (51,5 %), dont 102 (96 %) sont des pathologies étranglées. Le gros intestin était concerné dans les 100 autres cas (48,5 %) dont 45 (45 %) obstructions étranglées. Le taux de survie variait en fonction des pathologies et était globalement de 51,5 %, de 42,2 % pour les pathologies de l'intestin grêle et de 61 % pour celles du gros intestin. Afin de pouvoir affiner le pronostic avant la décision chirurgicale définitive, des indices de gravité et de choc étaient utilisés. L'incidence des complications postopératoires était plus importante (55,2 %) et le délai de récupération était significativement plus long pour les affections de l'intestin grêle que pour les affections du gros intestin. L'état de choc et l'iléus paralytique étaient les complications les plus fréquentes représentant 65 % des causes de mortalité en post-opératoire. Des taux de survie significativement différents sont observés en fonctions de l'indice de gravité et de choc. Le temps de récupération est également significativement différent en fonction de l'indice de choc et tout cela confirme l'importance d'un diagnostic précoce en cas de pathologie abdominale aiguë afin d'améliorer les taux de survie.

Summary

Retrospective study of 206 cases of surgical intestinal pathologies in the horse : incidence, diagnosis, prognosis and complications.

This retrospective study of 206 surgical colic cases shows the incidence of the different types of pathologies. The small intestine is concerned in 106 (51,5 %) cases with 102 (96 %) strangulation obstructions. The remaining 100 cases (48,5 %) are large intestine obstructions with 45 (45 %) strangulation obstructions. The global survival rate is of 51,5 %, of 42,2 % for small intestine and of 61 % for large intestine. A gravity and a shock score permit to define the prognosis before the decision for surgery. The incidence of the postoperative complications is higher (55,2 %) and the time for recovery is significantly longer for small intestinal pathologies than for large intestine affections. Shock and paralytic ileus are the most frequent complications accounting for 65 % of post operative mortalities. The survival rates are significantly different according to gravity and shock score. The time of recovery is also significantly different in function of the

shock score. These findings show the importance of rapid diagnosis of the acute abdominal disease in order to improve the outcome.

Introduction

Les pathologies abdominales aiguës constituent une des premières causes de mortalité chez le cheval (Cohen *et al.*, 1995). Le taux de survie reste faible malgré l'évolution des techniques d'anesthésie, de chirurgie et de soins intensifs. Il varie de 34 % à 56 % selon les auteurs (Ducharme *et al.*, 1983; Pascoe *et al.*, 1983 ; Parry, 1983 ; Hunt *et al.*, 1986 ; Kersjes *et al.*, 1988 ; McCarthy et Hutchins, 1988 ; Ebert, 1994). Plus rarement, des études annoncent un taux de survie se situant entre 71 et 74 % (Huskamp, 1982 ; Becker et Breuer, 1985 ; Phillips et Walmsley, 1993). Toutefois, les pathologies rencontrées, le stade d'évolution du choc septique au moment où le cheval est référé et les critères de décision chirurgicale diffèrent largement d'un centre à l'autre.

Les pathologies intestinales chirurgicales peuvent être classées selon la localisation de la pathologie (duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon replié et colon flottant) mais aussi suivant le degré de l'altération de la vascularisation de l'organe. On parle ainsi de pathologies intestinales étranglées tels l'incarcération, le volvulus, l'invagination ou la torsion. Dans ce dernier cas des lésions d'infarctissement et de nécrose intestinale se développent en quelques heures après le début des symptômes (White *et al.*, 1980 ; Snyder *et al.*, 1988). La résorption d'endotoxines bactériennes entraîne l'apparition d'un état de choc responsable des hauts taux de mortalité observés dans ce cas (Snyder *et al.*, 1989 ; Moore et Bertone, 1992 ; Sertheyn *et al.*, 1994). Lors de volvulus du gros intestin, Harrison (1988) rapporte par exemple des taux de mortalité de 65,3 %.

On parle d'obstruction simple, lorsque la vascularisation de l'organe n'est pas entreprise, c'est le cas lors du déplacement vers le haut et vers la droite du colon replié ventral et dorsal gauche (Huskamp et Kopf, 1983) ou lors de l'accrochement néphro-splénique (Caudron *et al.*, 1996 ; Hofmeister *et al.*, 1998). L'évolution de la pathologie est plus lente

mais la distension sévère de l'organe peut finalement provoquer des altérations de la microcirculation (Ebert, 1994) et de l'innervation, conduire à un risque chirurgical majeur (Hackett, 1983) et entraîner des symptômes de choc (Allen et Tyler, 1990 ; Hofmeister *et al.*, 1998).

Etant donné le faible taux de survie lors de coliques chirurgicales et l'investissement financier à consentir pour la réalisation de telles chirurgies, l'évaluation d'un pronostic précis s'avère indispensable. Celui-ci est généralement posé à partir du degré de perturbation de la fonction cardiovasculaire (Parry *et al.*, 1983 ; Reeves *et al.*, 1989). Etant donné le développement de diverses thérapeutiques permettant de retarder l'apparition de l'état de choc, il nous est apparu indispensable de proposer un indice de gravité basé sur des paramètres cliniques simples et utilisable pour l'ensemble des pathologies chirurgicales intestinales. Celui-ci a été utilisé précédemment dans une étude portant sur la comparaison du traitement chirurgical ou non chirurgical de l'accrochement néphro-splénique (Caudron *et al.*, 1996). Il a ici été modifié afin d'être adapté à toutes les pathologies abdominales aiguës chirurgicales. Une étude rétrospective portant sur 200 cas de pathologies abdominales chirurgicales nous a permis ensuite de définir sa valeur pronostique (Grulke *et al.*, 2000). En outre, un indice de choc se basant sur l'intégrité de la fonction cardiovasculaire et évalué sur base de paramètres cliniques et sur le résultat de paramètres sanguins, établi par Parry (1986) et White (1990) a également été utilisé et s'est avéré être d'une valeur pronostique identique à l'indice de gravité (Grulke *et al.*, 2000).

Alors que Hunt et collaborateurs (1986) et Ebert (1994) insistent sur l'importance des soins post-opératoires, peu d'études rapportent l'incidence des complications rencontrées et l'issue finale en fonction de l'état préopératoire. Les buts recherchés par cette étude rétrospective étaient donc les suivants : décrire l'incidence des pathologies rencontrées dans notre région, étudier le taux de survie en fonction de la pathologie et des indices de gravité et de choc, préciser l'incidence et le type des complications chez les survivants et les non survivants et étudier le temps de récupération en fonction de la localisation de la pathologie et des indices de gravité et de choc.

Matériel et méthode

Le même protocole d'évaluation clinique était appliqué pendant 4 ans (1995-1998) sur 206 chevaux présentés pour coliques chirurgicales. Ils étaient âgés de 4 mois à 25 ans (âge moyen : 9 ans). Il y avait 99 juments, 74 hongres et 33 étalons. Le poids variait entre 75 et 850 kg (moyenne : 550 kg) et les races étaient essentiellement des demi-sang (156) mais aussi 16 poneys, 9 trotteurs, 6 pur-sang anglais, 5 pinto, 5 chevaux de traits, 4 pur-sang arabes, 2 anglo-arabes, 2 appaloosas et un andalou.

La décision chirurgicale était basée sur la présence d'anomalies au fouiller rectal, de douleur abdominale ne répondant pas ou peu aux analgésiques de courte durée d'action, d'une diminution des bruits digestifs et/ou d'une distension abdominale ainsi que sur la présence éventuelle de reflux gastrique tout en considérant le résultat des examens complémentaires. Dans certains cas, la décision pouvait être basée sur un seul critère mais en général plusieurs éléments entraient en ligne de compte. Dans les cas douteux, le cheval était réévalué toutes les heures ou toutes les deux heures.

L'indice de gravité (IG) (Grulke *et al.*, 2000) comporte 3 grades et était établi en se basant sur quatre paramètres cliniques d'évaluation du degré d'obstruction intestinale. Ce sont la possibilité d'exploration par fouiller rectal et la distension des organes, la distension abdominale extérieure, l'intensité et la fréquence des bruits digestifs et l'intensité de la douleur (tableau I).

Tableau I.

Description des paramètres composant l'indice de gravité (IG) en fonction de son grade.

	Indice de gravité grade I	Indice de gravité grade II	Indice de gravité grade III
--	--------------------------------------	---------------------------------------	--

Fouiller rectal	exploration possible, distension localisée	exploration partielle, distension plus marquée	exploration impossible, distension sévère
Bruits digestifs	normaux	diminution partielle	diminution généralisée ou absence
Distension abdominale	absente	modérée	sévère, bilatérale
Douleur	faible ou absente	modérée, répondant aux analgésiques	violente ou dépression

D'après Grulke et al. (2000).

L'indice de choc (IC) (Parry, 1986; White, 1990) comporte 4 grades et est établi en se basant sur 6 paramètres évaluant le système cardio-vasculaire cliniquement et sur base de valeurs de paramètres sanguins. Les paramètres cliniques sont la fréquence cardiaque et respiratoire et la pression artérielle systolique. Les paramètres biochimiques sont l'hématocrite, le taux de lactates et d'urée (tableau II). Les chevaux dont l'indice de choc était de grade 4 étaient euthanasiés après la réception et n'étaient donc pas repris dans cette étude.

Tableau II.

Description des paramètres composant l'indice de choc (IC) et de la valeur de ces derniers en fonction du grade de l'IC.

	Indice de choc grade I	Indice de choc grade II	Indice de choc grade III	Indice de choc grade IV
Fréq. cardiaque	< 60	60 – 80	80 – 100	> 100
Fréq. respiratoire	< 25	25 – 35	35 – 45	> 45
Pression art. syst. (mmHg)	> 110	90 – 110	70 – 90	< 70
Hématocrite (%)	< 45	45 – 55	55 – 65	> 65
Lactates (mg/dL)	< 75	< 75	75 – 100	> 100
Urée (mg/dL)	< 40	40 – 55	55 – 70	> 70

Fréq. = fréquence art. syst. = artérielle systolique

D'après White (1990) et Parry et al., (1986).

Avant l'induction de l'anesthésie, on administrait une antibiothérapie sous forme de pénicilline sodique (20000 UI/kg, IV), un traitement anti-inflammatoire et analgésique à la flunixinine méglumine (1,1 mg/kg, IV) par voie intraveineuse et une dose de vitamine E – sélénium. En cas de perturbations métaboliques, des perfusions à base de solution de Ringer, de bicarbonates ou de NaCl hypertonique 7,2 % étaient administrées avant l'induction de l'anesthésie. La prémédication était réalisée à l'aide de xylazine en intraveineuse à raison de

0,6 mg/kg. Pour les chevaux en état de choc sévère la dose de xylazine était réduite ou supprimée. L'anesthésie était induite par l'administration de guaïacolate de glycérol éther (10 %) et de thiopental (2 g dans 500 mL) (deux premières années de l'étude) ou par une injection de (pour les 2 autres années). L'intubation endotrachéale était effectuée dès que le cheval était couché. Celui-ci était alors transféré dans la salle d'opération. La maintenance de l'anesthésie générale était réalisée à l'isoflurane parfois associée à de la kétamine. La respiration était contrôlée de manière à tenter d'éviter l'hypoventilation.

Le cheval était placé en décubitus dorsal. Après préparation aseptique du site chirurgical, la ligne blanche était incisée en avant de l'ombilic sur environ 15 à 20 cm. On réalisait une exploration systématique de l'intestin grêle à partir du cæcum en suivant le repli iléo-caecal et du colon replié en partant du ligament caeco-colique. L'estomac et le colon flottant étaient également palpés. Un repositionnement des intestins déplacés était effectué. En cas de tympanisme du gros intestin une ponction-aspiration dégonflait l'excès de gaz. En cas d'impaction importante une entérotomie permettait la vidange. Si une atteinte vasculaire était jugée irréversible en chirurgie une entérectomie de l'intestin grêle, du cæcum ou du colon flottant était réalisée. Une irrigation continue des intestins extériorisés se faisait avec du liquide physiologique à température corporelle et une irrigation plus abondante était effectuée avant de refermer l'abdomen. La suture de la paroi musculaire était réalisé par la pose de points de Blair-Donati et de points simples (Vicryl® 2). Un surjet simple était posé sur les tissus sous-cutané (Vicryl® 1) tandis que des points simples étaient posés sur la peau (Mersuture® 0). Les conditions d'asepsie étaient maintenues au niveau de la plaie chirurgicale par un pansement stérile maintenu en place grâce à un bandage élastique (Elastoplast®). Celui-ci était mis en place directement lors de l'arrivée dans le box de réveil en suspendant quelques instants le cheval anesthésié par les membres.

Les soins intensifs post-opératoires consistaient en une surveillance étroite du cheval toutes les deux heures avec un examen général et le retrait du reflux gastrique. La sonde était laissée en place jusqu'à disparition du reflux et reprise du transit digestif. Le traitement consistait en l'administration intraveineuse de solutions de Ringer ou de Ringer-acétate isotoniques et de bicarbonates afin de maintenir ou restaurer l'hydratation et l'équilibre ionique et acido-basique. Une antibiothérapie à large spectre était administrée par voie intraveineuse à l'aide de pénicilline sodique (20000 UI/kg/8 heures) et de gentamicine (3 mg/kg/12 heures)

parfois modifiée en enrofloxacin (2,5 mg/kg/12 heures) en cas de signes infectieux. De la flunixin méglumine était donnée à raison de 0,25 mg/kg/8 heures et, dans certains cas, des doses analgésiques (1,1 mg/kg) étaient également administrées. Depuis la deuxième année du bilan de l'énoxaparine, une héparine fractionnée, était administrée systématiquement (0,16 mg/kg) une fois par jour par voie sous-cutanée ainsi que dans certains cas un traitement à l'acépromazine (0,04 mg/kg/8 heures) par voie intramusculaire. Des pansements assurant un support de la fourchette étaient posés au niveau des sabots antérieurs. Des bilans sanguins réguliers étaient effectués : hémocrite et analyse des gaz sanguins veineux toutes les 4 heures, taux de globules blancs et formule leucocytaire toutes les 12 heures, ions, protéines totales, urée et créatinine selon les besoins. L'évaluation de l'état général, l'évacuation du reflux gastrique et les bilans sanguins permettaient une détection précoce des complications et une adaptation des soins.

L'état de choc était diagnostiqué sur base d'une augmentation de la fréquence cardiaque (> 80 battements/minute), d'une diminution de l'amplitude du pouls et de la pression artérielle systolique (< 90 mmHg), d'une augmentation du temps de remplissage capillaire, d'une hémococoncentration (hémocrite $> 48\%$) et d'une acidose métabolique (BE < -5). Le diagnostic d'iléus paralytique était posé lorsque 48 heures après l'intervention les chevaux présentaient toujours du reflux gastrique ainsi qu'une diminution des bruits digestifs. Des traitements au métoclopramide (0,04 mg/kg/h toutes les 8 heures, voie intraveineuse) et au cisapride (1 mg/kg/8 heures, voie rectale) étaient alors instaurés. La péritonite aiguë était diagnostiquée sur base d'un abattement présenté par l'animal, d'une diminution du transit et des bruits digestifs, par une leucopénie et par une augmentation du nombre de globules blancs (GB) dans le liquide péritonéal (nombre de GB > 100000 /microlitre). Un diagnostic d'entérite proximale était posé lors d'abattement et de reflux gastrique hémorragique. Un diagnostic de typhlocolite était suspecté lors d'abattement et de diarrhée profuse.

Pour chaque cheval survivant, un temps de récupération était mesuré, c'est-à-dire le temps (en heures) entre l'arrêt de l'anesthésie jusqu'au rétablissement du transit digestif et la normalisation de l'état cardiovasculaire. Les quatre paramètres évalués sont la normalisation des bruits digestifs, l'émission de matières fécales normales, l'absence de reflux gastrique et la normalisation de la fréquence cardiaque (< 45 battements/minute). C'était en général à ce moment que les chevaux ont été nourris progressivement avec du foin et du mash.

Pour chaque cas, la localisation de la pathologie, la présence ou non d'un étranglement, l'issue de la chirurgie, le moment et la cause de l'euthanasie en post-opératoire pour les non survivants ainsi que les complications éventuelles chez les survivants ont été inventoriés.

L'analyse statistique comprend un test du Chi-carré qui est utilisé pour voir s'il existe une relation entre les taux de survie et l'IG et l'IC chez les chevaux atteints d'une pathologie de l'intestin grêle et chez les chevaux atteints d'une obstruction du gros intestin ($P < 0.05$). Une analyse de variance à deux critères est utilisée pour comparer les temps moyens de récupération chez les chevaux survivants suivant la localisation de la pathologie (intestin grêle ou gros intestin) et l'IG d'une part et l'IC d'autre part ($P < 0.05$).

Résultats

Sur les 206 chevaux réceptionnés pour colique chirurgicale, 106 avaient survécu ce qui représentait un taux de survie global de 51,5 %. Ces derniers quittaient la clinique après en moyenne 15 jours de soins. Parmi ceux qui n'avaient pas survécu, 42 chevaux étaient euthanasiés en per-opératoire en raison de lésions vasculaires intestinales étendues qui étaient jugées irrémédiables et/ou un état de choc irréversible. En excluant ces chevaux, le taux de survie global des chevaux ayant subi une intervention chirurgicale complète s'élevait à 64,6 %.

Les soins post-opératoires étaient donc entrepris chez 164 chevaux. Septante-neuf d'entre eux ne développaient que peu ou pas de complications. Par contre, 85 chevaux présentaient des complications majeures, parfois multiples et qui entraînaient l'euthanasie de 58 d'entre eux. Le tableau III reprend l'incidence de chaque complication rencontrée en fonction de la localisation de la pathologie et de l'issue finale. Le choc endotoxique apparaissait le plus souvent tôt après le réveil (en moyenne 13 heures après la fin de l'anesthésie) et a entraîné la mort du cheval dans tous les cas. L'iléus paralytique était rencontré surtout lors de pathologies de l'intestin grêle et était associé à un pronostic plus favorable que le choc endotoxique car chez 18 chevaux sur 32 le transit digestif s'est normalisé après en moyenne 5 jours. Parmi les chevaux morts dans certains cas des lésions vasculaires de l'intestin ou de péritonite étaient mises en évidence à l'examen nécropsique, mais dans 5 cas aucune lésion macroscopique n'était visible.

Tableau III.

Type et incidence des complications (unique ou multiples) rencontrées chez 164 chevaux ayant subi une intervention chirurgicale complète pour une pathologie intestinale obstructive en fonction de la localisation de la pathologie et de l'issue finale de l'intervention.

type de complication	intestin grêle survivant nombre (%)	intestin grêle mort nombre (%)	gros intestin survivant nombre (%)	gros intestin mort nombre (%)	total nombre (%)
iléus paralytique	15 (26,3)	10 (26,3)	3 (6,1)	4 (14,3)	32 (18,6)
choc endotoxique	-	14 (36,8)	-	8 (28,6)	22 (12,8)
péritonite	9 (15,8)	5 (13,2)	7 (14,3)	3 (10,7)	24 (14)
douleur	11 (19,3)	1 (2,6)	1 (2)	2 (7,1)	15 (8,7)
typhlocolite/entérite	1 (1,8)	2 (5,3)	11 (22,4)	1 (3,6)	15 (8,7)
phlébite	10 (17,5)	-	3 (6,1)	-	13 (7,6)
fourbure	1 (1,8)	1 (2,6)	2 (4,1)	2 (7,1)	6 (3,5)
infection plaie	6 (10,5)	-	13 (26,5)	-	19 (11)
hernie abd. (2^{ième} chir.)	2 (3,5)	-	1 (2)	-	3 (1,7)
rupture estomac	-	1 (2,6)	-	3 (10,7)	4 (2,3)
fracture au réveil	-	2 (5,3)	-	1 (3,6)	3 (1,7)
insuff. card.	-	1 (2,6)	-	1 (3,6)	2 (1,2)
hyperthermie	-	-	7 (14,3)	-	7 (4,1)
récidive de colique chir.	2 (3,5)	1 (2,6)	1 (2)	3 (10,7)	7 (4,1)
total	57 (100)	38 (100)	49 (100)	28 (100)	172 (100)

abd. : abdominal chir. : chirurgie insuff. card. : insuffisance cardiaque

Intestin grêle

Sur les 206 cas chirurgicaux, 106 concernaient l'intestin grêle et 45 de ces chevaux quittaient la clinique ce qui représente un taux de survie global de 42,4 % pour les pathologies de l'intestin grêle. La majorité de ces cas (n = 102) étaient des obstructions étranglées. On observait des incarcérations au niveau du foramen épiploïque (n = 54), des défauts du mésentère ou des persistances de l'artère vitelline (n = 3), des volvulus (n = 20), des hernies inguinales étranglées (n = 12), des lipomes pédonculés (n = 10), des invaginations iléo-caecales (n = 2) et une hernie diaphragmatique (n = 1). Les obstructions simples rencontrées au niveau de l'intestin grêle étaient l'impaction de la valvule iléo-caecale (n = 2), l'adhérence entre deux anses d'intestin grêle (n = 1) et un diverticule de l'iléon (n = 1).

Parmi les chevaux opérés pour une pathologie de l'intestin grêle, 27 chevaux étaient euthanasiés sur la table d'opération étant donné la gravité des lésions intestinales évaluées macroscopiquement. Les soins post-opératoires étaient entrepris sur 79 chevaux. Vingt-sept d'entre eux ne présentaient pas de complication, voire une complication mineure aisément contrôlée. Par contre, 52 chevaux présentaient une ou plusieurs complications sévères qui s'étaient avérées irréversibles chez 34 chevaux. Les complications sévères les plus fréquemment observées étaient un état de choc post-opératoire (n = 14, tous euthanasiés), un iléus paralytique (n = 25 ; 15 survivants), une péritonite (n = 17 ; 9 survivants), une douleur excessive (n = 12 ; 11 survivants) et une phlébite (n = 10, tous survivants).

Le tableau IV détaille pour les différentes pathologies de l'intestin grêle le nombre d'euthanasies réalisées en chirurgie au vue de lésions irréversibles et étendues, le nombre d'euthanasies précoces (endéans les 48 heures) et le nombre d'euthanasies tardives (3 jours et plus). Le nombre et le pourcentage de survivants sont également mentionnés ainsi que l'incidence des complications majeures parmi ces survivants.

Tableau IV.

Incidence d'euthanasie en chirurgie, d'euthanasie post-opératoire précoce (endéans les 48 heures), d'euthanasie tardive, nombre et pourcentage de survivants ainsi que incidence des complications majeures en fonction des diverses pathologies de l'intestin grêle.

pathologie type, nombre (% du total)	euthanasie en chirurgie	euthanasie précoce, < 48h	euthanasie tardive, > 48 h	survivants nombre (%)	survivants présentant des complications majeures
foramen épiploïque 54 (26)	12	11	6	25 (46)	11
volvulus 20 (10)	11	3	2	4 (20)	3
hernie inguinale 12 (6)	2	1	0	9 (75)	1
lipome pédonculé 10 (5)	0	5	1	4 (40)	2

autres incarcérations ou hernies 4 (2)	2	0	2	0 (0)	0
invagination iléo- caecale 2 (1)	0	0	2	0 (0)	0
obstructions simples 4 (2)	0	0	1	3 (75)	0

Gros intestin

Sur les 206 cas chirurgicaux, 100 cas concernaient le gros intestin. Le taux de survie global était de 61 %. Dans plus de la moitié des cas (n = 55) la pathologie n'était pas étranglée. Le taux de survie dans le groupe des pathologies non-étranglées du gros intestin était de 83,6 %. Ces cas d'obstruction non étranglée, incluaient surtout des accrochements néphro-spléniques du colon ventral et dorsal gauche (n = 26), dont 4 accompagnés de torsion non étranglée des portions II et III, des déplacements de l'anse pelvienne vers le haut et vers la droite (n = 22), des obstructions simples du colon flottant par des aliments (n = 4), par un entérolithe (n = 2) ou par une tumeur (n = 1).

Les cas d'obstruction étranglée du gros intestin incluaient des torsions de 360° des portions II et III du colon replié (n = 10), des volvulus ou torsions des 4 portions (n = 24), des torsions du caecum (n = 6), des invaginations caeco-coliques (n = 2), une hernie inguinale de l'anse pelvienne (n = 1) et des volvulus du colon flottant (n = 2). Le taux de survie pour l'ensemble des pathologies étranglées est de 33 %.

Parmi les chevaux opérés pour une pathologie du gros intestin, 15 chevaux étaient euthanasiés sur la table d'opération étant donné la gravité des lésions macroscopiques présentées. Les soins post-opératoires étaient entrepris sur 85 chevaux. Les complications présentées par 52 d'entre eux étaient aisément contrôlées et ceux-ci présentaient une normalisation rapide du transit digestif (endéans moins de 48 h). Par contre, 33 chevaux présentaient une ou plusieurs complications sévères qui menaient à l'euthanasie de 24 d'entre eux. Les complications les plus fréquemment rencontrées étaient des infections de la plaie abdominale (n = 13, tous survivants), des typhlocolites (n = 12 ; 11 survivants), des péritonites

(n = 10 ; 7 survivants), des états de choc endotoxique (n = 8, tous morts) et des phases d'hyperthermie après l'arrêt des traitements antibiotiques (n = 7, tous survivants).

Le tableau V détaille pour les différentes pathologies du gros intestin le nombre d'euthanasies réalisées en chirurgie au vue de lésions irréversibles et étendues et de l'état de choc sévère, le nombre d'euthanasies précoces (endéans les 48 heures) et le nombre d'euthanasies tardives (3 jours et plus). Le nombre et le pourcentage de survivants sont également mentionnés ainsi que l'incidence des complications majeures parmi ces survivants.

Tableau V.

Incidence d'euthanasie en chirurgie, d'euthanasie post-opératoire précoce (endéans les 48 heures), d'euthanasie tardive, nombre et pourcentage de survivants ainsi que incidence des complications majeures en fonction des diverses pathologies du gros intestin.

pathologie type, nombre (% du total)	euthanasie en chirurgie	euthanasie précoce, < 48 h	euthanasie tardive, < 48 h	survivants nombre (%)	survivants présentant des complications majeures
ENS 26 (13)	0	3	3	20 (77)	0
DHD AP 22 (11)	1	0	0	21 (95)	3
autres obstr. simples 7 (3)	0	1	1	5 (71)	1
torsion 4 p 24 (12)	13	6	2	3 (13)	0
torsion II/III 10 (5)	1	5	0	4 (40)	2
torsion caecum 6 (3)	0	1	2	3 (50)	1

autres obstr. étranglées 5 (2)	0	0	0	5 (100)	2
---	---	---	---	---------	---

ENS : accrochement néphro-splénique, DH D AP : déplacement vers le haut et vers la droite de l'anse pelvienne, obstr. : obstructions, 4 p : ensemble du colon replié, II/III : portions gauches (II et III) du colon replié

Les taux de survie sont significativement différents pour les chevaux présentant une obstruction de l'intestin grêle et du gros intestin en fonction de l'IG et de l'IC ($P < 0,05$). Les tableaux VIa et VIb montrent la distribution des survivants et non survivants avec les indices correspondants. Les valeurs de chi carré et de P sont également mentionnées. Le meilleur taux de survie est celui des pathologies chirurgicales du gros intestin avec un IG I (88 %), le taux de survie le plus faible par contre est celui des obstructions de l'intestin grêle avec un IC III (5 %). L'analyse statistique ne peut être effectuée pour chacune des pathologies vu le nombre insuffisant de cas dans les différentes catégories mais les figures 1 et 2 illustrent une nette différence du taux de survie pour l'incarcération de l'intestin grêle au niveau du foramen épiploïque et pour les obstructions étranglées du gros intestin (pathologies avec le plus gros effectif) suivant l'IG et l'IC.

Fig. 1a et 1b

Pourcentage de chevaux survivants et non survivants présentant une incarceration de l'intestin grêle au niveau du foramen épiploïque (FE) ($n = 54$) en fonction de l'indice de gravité (nombre de survivants et non survivants en IG I $n = 9/1$; IG II $n = 13/12$; IG III $n = 3/16$) et de choc (nombre de survivants et non survivants en IC I $n = 19/9$; IC II $n = 5/16$; IC III $n = 1/4$).

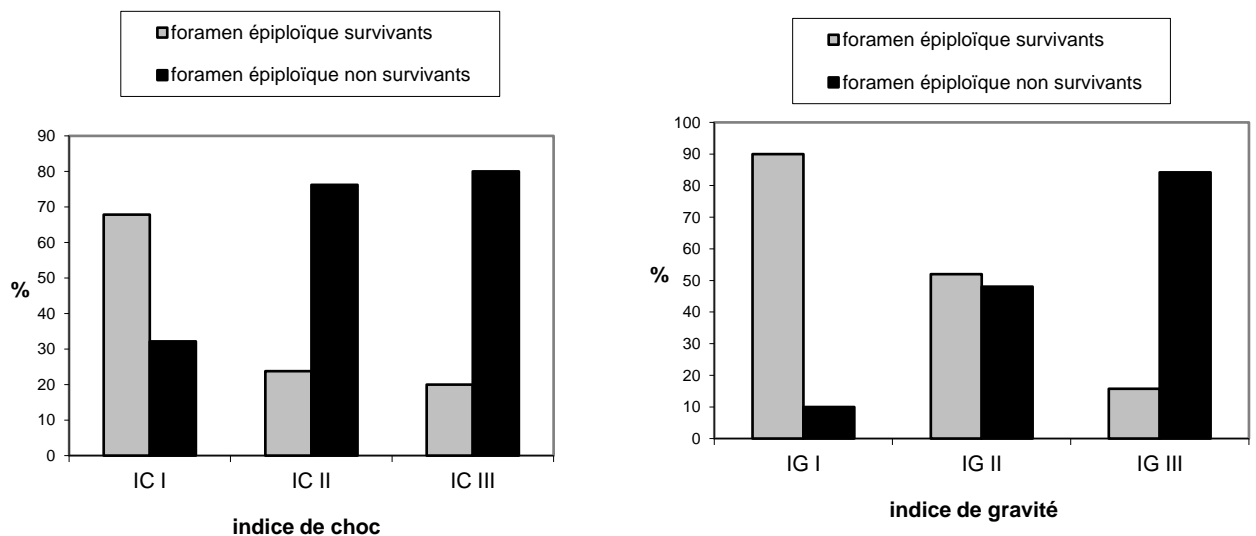
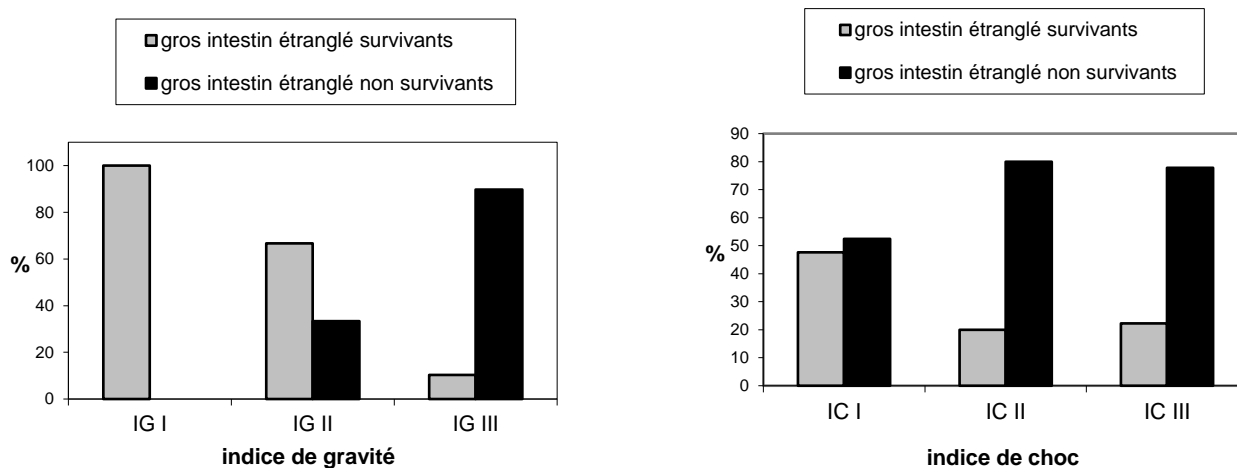


Fig. 2a et 2b

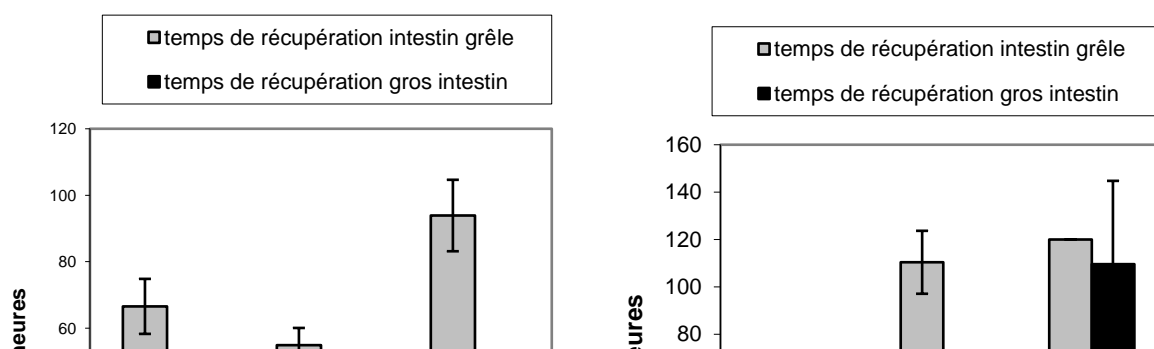
Pourcentage de chevaux survivants et non survivants présentant une obstruction étranglée du gros intestin (n = 45) en fonction de l'indice de gravité (nombre de survivants et non survivants en IG I n = 4/0 ; IG II n = 8/4 ; IG III n = 3/26) et de choc (nombre de survivants et non survivants en IC I n = 10/11 ; IC II n = 3/12 ; IC III n = 2/7)



Parmi l'ensemble des chevaux survivants (n = 106), le temps moyen de récupération est significativement différent ($P < 0.05$) chez les chevaux présentant une pathologie de l'intestin grêle ($68,25 \pm 5,03$ heures) de ceux souffrant du gros intestin ($34,79 \pm 8,83$ heures). Le temps moyen de récupération est significativement différent selon l'IC. Il varie de 27 heures pour les pathologies du gros intestin en IC I à 109 heures pour l'IC III, pour les chevaux souffrant d'une pathologie de l'intestin grêle ce temps est de 62 heures pour l'IC I et passe à 120 heures pour l'IC III (valeur d'un seul survivant de cette classe). Par contre, ils n'est pas significativement différent selon l'IG, en particulier pour les pathologies du gros intestin (figures 3a et 3b).

Fig. 3a et 3b

Temps moyen de récupération (Tr) (en heures) pour les pathologies de l'intestin grêle et du gros intestin en fonction de l'indice de gravité (IG) et de l'indice de choc (IC). Il y a une différence significative du Tr ($P < 0,05$) entre la localisation et entre les grades de l'indice de choc mais non entre ceux de l'indice de gravité.



Discussion

Le taux global de survie ainsi que les taux pour les différents types d'obstructions sont comparables à ceux trouvés dans la littérature par d'autres équipes (Ducharme *et al.*, 1983 ; Pascoe *et al.*, 1983 ; Hunt *et al.*, 1986 ; Kersjes *et al.*, 1988). Certains centres présentent des taux de survie supérieurs (Phillips et Walmsley, 1993 ; Huskamp, 1982) mais la situation de la clinique par rapport à la clientèle, la présence d'une propre clinique ambulatoire et enfin les critères de décision chirurgicale interviennent grandement dans le taux global de survie.

L'incidence des diverses pathologies étranglées ou non étranglées rencontrées dans notre centre varie nettement par rapport à celle rapportée par d'autres études. C'est surtout le cas pour l'incarcération au niveau du foramen épiploïque. Cette pathologie représente à elle seule 26,2 % du nombre total des coliques chirurgicales rencontrées ici contrairement à des pourcentages variant de 2 à 7 % dans d'autres centres (Turner *et al.*, 1984, McCarthy et Hutchins, 1988 ; Englebert *et al.*, 1993 ; Vachon *et al.*, 1995). Les obstructions non étranglées de l'intestin grêle par contre sont rares dans notre bilan (4 %) alors que dans d'autres centres l'impaction de l'iléon, une de ces obstructions non-étranglées, représente 6 voire 10 % des cas chirurgicaux (Kersjes *et al.*, 1988 ; Hanson *et al.*, 1998). Ceci démontre l'importance de réaliser une enquête propre à chaque région car les conditions d'élevage, d'entretien et d'alimentation peuvent fortement influencer l'incidence des pathologies rencontrées (Embertson *et al.*, 1985 ; Meyer, 1991, Hassel *et al.*, 1999).

Divers auteurs (Hunt *et al.*, 1986 ; McCarthy et Hutchins, 1988 ; Baxter, 1989 ; Baxter, 1992) soulignent l'importance des soins postopératoires puisqu'ils observent qu'une majorité

des cas développe des complications post-opératoires uniques ou multiples et éventuellement fatales. Dans notre étude 52 % des chevaux ont présenté des complications post-opératoires sévères et 35 % des chevaux en sont morts. Les complications les plus fréquemment rencontrées étaient le développement d'un état de choc sévère ou d'un iléus paralytique. Ces deux complications sont également les plus fréquentes dans le bilan de Hunt et collaborateurs (1986) ainsi que chez d'autres auteurs (McCarthy et Hutchins, 1988 ; Baxter, 1989) même si les pourcentages exacts ne sont pas toujours mentionnés. D'autres auteurs par contre citent des complications différentes comme les fractures des os longs (Ducharme *et al.*, 1983) ou la péritonite (Phillips et Walmsley, 1993) comme cause importante des mortalités post-opératoires.

L'état de choc apparaît habituellement tôt pendant la phase de réveil et est souvent irréversible lorsqu'il atteint un stade avancé. Il s'explique par la présence dans l'abdomen d'un intestin non viable qui se nécrose et une quantité importante d'endotoxines bactériennes est alors libérée (Moore *et al.*, 1981 ; Morris, 1991). Il n'est pas rare que l'on constate des lésions dues à des phénomènes d'ischémie-reperfusion au niveau d'un intestin qui semble viable au moment de la levée de l'étranglement vasculaire et qui, à l'autopsie, apparaît nécrosé (Moore et Bertone, 1992) . Ce phénomène s'explique par une production accrue de formes activées de l'oxygène lors de la reperfusion post-ischémique (Moore *et al.*, 1995 ; Serteyn *et al.*, 1994). Ce stress oxydant peut encore être renforcé par la libération de formes activées de l'oxygène et de myéloperoxydase provenant des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles activés (Moore et Bertone, 1992 ; Grulke *et al.*, 1999).

Divers auteurs confirment que l'iléus paralytique post-opératoire reste une cause de mortalité majeure (Hunt *et al.*, 1986 ; Gerring *et al.*, 1991) et concerne essentiellement les pathologies obstructives de l'intestin grêle (Baxter, 1992 ; Snyder et Van Hoogmoed, 2000) comme nous le voyons également dans notre bilan. Diverses études sont menées afin de mieux comprendre la motricité intestinale et de trouver des traitements favorisant la motricité intestinale (Gerring, 1991 ; Van Hoogmoed, 2000). Il apparaît que dans les cas d'iléus paralytique la coordination de la motricité intestinale fait défaut, et en particulier la coordination entre l'estomac et le duodénum (Gerring, 1991). Les facteurs prédisposants sont multiples mais la distension intestinale, des phénomènes d'ischémie-reperfusion, le choc endotoxique et les résections intestinales sont généralement incriminés (Baxter, 1989 ; Snyder et Van Hoogmoed,

2000). L'étiologie précise reste hypothétique mais on soupçonne un tonus sympathique excessif via une activation de récepteurs alpha-2 et une inhibition de la libération d'acétylcholine par la norépinéphrine (Baxter, 1989 ; Snyder et Hoogmoed, 2000). A cause de la complexité de ce problème, les traitements visent essentiellement à soutenir l'état général du cheval, à corriger les déséquilibres acido-basique et électrolytique et à réaliser un suivi très régulier avec retrait du reflux gastrique toutes les 2 heures (entre 4 et 10 litres) afin d'éviter toute douleur par distension gastrique et tout risque de rupture. L'utilisation de stimulants de la motricité tel le métoclopramide, le cisapride (Gerring *et al.*, 1991), l'érythromycine et la lidocaïne (Snyder et Hoogmoed, 2000) est généralement conseillée, mais aucun traitement ne montre des effets positifs dans tous les cas.

L'incidence des fourbure post-opératoire est faible (6 cas sur 128 chevaux ayant survécu au moins 48 heures après l'intervention) contrairement à d'autres centres (exemple : 13 % des chevaux présentant une pathologie de l'intestin grêle dans une étude de Belknap *et al.*, 1989) et présente une distribution hétérogène car 5 des 6 cas sont survenus la première année, un autre la deuxième année du bilan et aucun cas par la suite. Ceci pourrait s'expliquer par le traitement préventif instauré de manière systématique à partir de la deuxième année de notre étude : surveillance minutieuse de la température des sabots et de la pulsation digitée, utilisation systématique de support de fourchettes et administration systématique d'enoxaparine. L'acépromazine est donnée en cas de pulsation augmentée ou de signes infectieux majeurs (péritonite, entérite) en absence d'état de choc.

Précédemment, nous avons montré la valeur pronostique de l'indice de gravité et de choc pour l'ensemble des pathologies intestinales obstructives (Grulke *et al.*, 2000). Au cours de la présente étude nous avons pu montrer que ces deux indices avaient également une valeur pronostique pour les pathologies de l'intestin grêle et du gros intestin. Même pour l'incarcération de l'intestin grêle au niveau du foramen épiploïque, l'IG est valable alors que les douleurs sont parfois sourdes (Walmsley, 1991). Cette observation est pertinente car l'incidence de la pathologie est élevée dans notre région. De plus, l'incarcération entrecroise souvent l'iléon ainsi qu'une grande partie du jéjunum (Turner *et al.*, 1984 ; Engelbert *et al.*, 1993) rendant souvent toute entérectomie illusoire. Toute persistance de douleur abdominale après administration d'analgésiques légers même sans lésion précise au niveau du fouiller rectal doit donc faire penser à une telle pathologie (Becker et Breuer, 1985 ; Walmsley, 1991).

Chez les chevaux survivants de notre étude, le temps moyen de récupération des chevaux présentant une pathologie de l'intestin grêle est significativement plus élevé que le temps moyen de récupération observé pour les pathologies du gros intestin. Divers auteurs confirment que les complications sont plus sévères (Hunt *et al.*, 1986 ; McCarthy et Hutchins, 1988 ; Baxter, 1992) et leurs temps de résolution plus longs chez les chevaux souffrant d'une pathologie de l'intestin grêle, ce qui est probablement dû au nombre plus élevé de pathologies étranglées et à l'iléus paralytique plus fréquent. Dans notre étude, le temps moyen de récupération ne variait pas de manière significative en fonction de l'IG ; par contre il variait significativement en fonction de l'IC. Ces résultats semblent indiquer que le degré d'obstruction pré-opératoire influence peu le temps de récupération chez les chevaux survivants. Par contre, l'existence de perturbations cardiovasculaires avant la chirurgie et la présence d'un certain degré d'état de choc influencent nettement le temps moyen de récupération. Des études plus approfondies devraient être menées afin de préciser les mécanismes physiopathologiques et surtout d'envisager les conséquences possibles d'une ischémie splanchnique généralisée.

En conclusion, cette étude rétrospective nous a permis de caractériser le type et l'incidence des pathologies rencontrées dans notre région, de valider sur plusieurs pathologies l'IG et l'IC et d'étudier l'efficacité des soins post-opératoires entrepris. De plus, cette étude souligne l'importance d'un diagnostic précoce et d'un transfert rapide du cheval souffrant de « coliques chirurgicales » vers un centre spécialisé avant toute détérioration de l'état cardiovasculaire.

Bibliographie

- ALLEN D., TYLER D.A. Pathophysiology of acute abdominal disease. *In* : The equine acute abdomen, Lea & Febiger, 1990, 65-89.
- BAXTER G.M. Postoperative complications and long-term prognosis of the colic patient. *Proc. Ann. Conv. Am. Ass. Equine Pract.*, 1989, **35**, 39-55.
- BAXTER G.M. Recognizing and managing the postoperative complications of equine abdominal surgery. *Vet. Med.*, 1992, **87**, 1113-1120.
- BECKER M., BREUER D. Ergebnisse der operativen Kolikbehandlung, dargestellt am Patientengut des Jahres 1983 der Pferdeklinik München-Riem. *Tierärztl. Prax.*, 1985, **13**, 199-204.

- BELKNAP J.K., MOORE J.N. Evaluation of heparin for prophylaxis of equine laminitis: 71 cases (1980-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **195**, 505-507.
- CAUDRON I., GRULKE S., MIESEN M., BENBAREK H., SERTEYN D. Choix d'un traitement lors d'accrochement du colon au niveau du ligament néphro-splénique chez le cheval : laparotomie ou réduction non chirurgicale. *Ann. Méd. Vét.*, 1996, **140**, 357-362.
- COHEN N.D., MATEJKA P.L., HONNAS C.M., HOOPER R.N., TEXAS EQUINE COLIC STUDY GROUP. Case- control study of the association between various management factors and development of colic in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **206**, 667-673.
- DUCHARME N.G., HACKETT R.P., DUCHARME G.R., LONG S. Surgical treatment of colic. Results in 181 horses. *Vet. Surg.* 1983, **12**, 206-209.
- EBERT R. Letalitätsaspekte der Kolik des Pferdes. *Pferdeheilkunde*, 1994, **10**, 89-93.
- EMBERTSON R.M., COLAHAN P.T., BROWN M.P., PEYTON L.C., SCHNEIDER R.K., GRANSTEDT M.E. Ileal impaction in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1985, **186**, 570-572.
- ENGELBERT T.A., TATE L.P., BOWMAN K.F., BRISTOL D.G. Incarceration of the small intestine in the epiploic foramen. Report of 19 cases (1983-1992). *Vet. Surg.*, 1993, **22**, 57-61.
- GANGL M., GRULKE S., DETILLEUX J., CAUDRON I., SERTEYN D. Clinical evaluation of a midazolam-ketamine combination as induction method prior to isoflurane anaesthesia in horses. 2000, soumis pour publication.
- GERRING E.L., KING J.N., EDWARDS G.B., PEARSON H., WALMSLEY J.P., GREET T.R.C. A multicentre trial of cisapride in the prophylaxis of equine post operative ileus. *Equine Vet. Educ.*, 1991, **3**, 143-145.
- GERRING E.L. Factors affecting gut motility. *Equine Vet. Educ.*, 1991, **3**, 146-148.
- GRULKE S., BENBAREK H., CAUDRON I., DEBY-DUPONT G., MATHY-HARTERT M., FARNIR F., DEBY C., LAMY M., SERTEYN D. Plasma myeloperoxidase level and polymorphonuclear leucocyte activation in horses suffering from large intestinal obstruction requiring surgery : preliminary results. *Can. J. Vet. Res.*, 1999, **63**, 142-147.
- GRULKE S., OLLE E., DETILLEUX J., GANGL M., CAUDRON I., SERTEYN D. Determination of a gravity and a shock score for the prognosis in equine surgical colic. 2000, soumis pour publication.
- HACKETT R.P. Nonstrangulated colonic displacement in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1983, **182**, 235-240.
- HANSON R.R., WRIGHT J.C., SCHUMACHER J., BAIRD A.N., HUMBURG J., PUGH D.G. Surgical reduction of ileal impactions in the horse: 28 cases. *Vet. Surg.*, 1998, **27**, 555-560.
- HARRISON I.W. Equine large intestinal volvulus. A review of 124 cases. *Vet. Surg.*, 1988, **17**, 77 – 81.
- HASSEL D.M., LANGER D.L., SNYDER J.R., DRAKE C.M., GOODELL M.L., WYLE A. Evaluation of enterolithiasis in equids: 900 cases (1973-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1999, **214**, 233-237.
- HOFMEISTER S., BECKER M., BÖCKENHOFF G. Beitrag sur Behandlung der Verlagerung des Colon ascendens in den Milz-Nieren-Raum. *Tierärztl. Prax.*, 1998, **26**, 85-93.
- HUNT J.M., EDWARDS G.B., CLARKE K.W. Incidence, diagnosis and treatment of postoperative complications in colic cases. *Equine Vet. J.*, 1986, **18**, 264-270.
- HUSKAMP B. The diagnosis and treatment of acute abdominal conditions in the horse: The various types and frequency as seen at the animal hospital in Hochmoor. *Proc. Int. Symp. Colic Res. Univ. Georgia, USA.*, 1982, **1**, 261-272.
- HUSKAMP B., KOPF N. Right dorsal displacement of the large colon in the horse. *Equine Pract.*, 1983, **5**, 20-29.

- KERSJES A.W., BRAS G.E., NEMETH F., VAN DER VELDEN M.A., FIRTH E.C. Results of operative treatment of equine colic with special reference to surgery of the ileum. *Vet. Quart.*, 1988, **10**, 17-25.
- McCARTHY R.N., HUTCHINS D.R. Survival rates and post-operative complications after equine colic surgery. *Austr. Vet. J.*, 1988, **65**, 40-43.
- MEYER H. Einfluss der Ernährung auf die Entstehung von Koliken (Verdauungsstörungen) beim Pferd. *Tierärztl. Prax.*, 1991, **19**, 515-520.
- MOORE J.N., WHITE N.A., BERG J.N., TRIM C.M., GARNER H.E. Endotoxemia following experimental intestinal strangulation obstruction in ponies. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, **45**, 330-332.
- MOORE R.M., BERTONE A.L. Perioperative medical therapy for horses with intestinal ischemia. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 1992, **14**, 1514-1522.
- MOORE R.M., MUIR W.W., GRANGER D.N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions : A review and its implications in the horse. *J. Vet. Int. Med.*, 1995, **9**, 115-132.
- MORRIS D.D. Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J. Vet. Int. Med.*, 1991, **5**, 167-181.
- PARRY B.W. Survey of 79 referral colic cases. *Equine Vet. J.*, 1983, **15**, 345-348.
- PARRY B.W., ANDERSON G.A., GAY C.C. Prognosis in equine colic : a comparative study of variables used to assess individual cases. *Equine Vet. J.*, 1983, **15**, 211-215.
- PARRY B.W. Prognostic evaluation of equine colic cases. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 1986, **8**, 98-104.
- PASCOE P.J., McDONELL W.N., TRIM C.M., VAN GORDER J. Mortality rates and associated factors in equine colic operations – a retrospective study of 341 operations. *Can. Vet. J.*, 1983, **24**, 76-85.
- PHILLIPS T.J., WALMSLEY J.P. Retrospective analysis of the results of 151 exploratory laparotomies in horses with gastrointestinal disease. *Equine Vet. J.*, 1993, **25**, 427-431.
- REEVES M.J., CURTIS C.R., SALMAN M.D., HILBERT B.J. Prognosis in equine colic patients using multivariable analysis. *Can. J. Vet. Res.*, 1989, **53**, 87-94.
- SERTEYN D., CAUDRON I., SZOKE M., FONTAINE G., STACQUEZ S., CHEVE D. Diagnostic et pronostic des pathologies intestinales aiguës chirurgicales du cheval. *Prat. Vét. Equine*, 1994, **26**, **2**, 135-145.
- SERTEYN D., PINCEMAIL J., MOTTART E., CAUDRON I., DEBY C., DEBY-DUPONT G., PHILLIPART C., LAMY M. Approche directe pour la mise en évidence des phénomènes radicalaires lors de myopathie postanesthésique equine : étude préliminaire. *Can. J. Vet. Res.*, 1994, **58**, 309-312.
- SNYDER J.R., OLANDER H.J., PASCOE R.J., HOLLAND M., KURPERSHOEK C.J. Morphologic alterations observed during experimental ischemia of the equine large colon. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 801-809.
- SNYDER J.R., PASCOE J.R., OLANDER H.J., SPIER S.J., MEAGHER D.M., BLEIFER D.R. Strangulating volvulus of the ascending colon in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **195**, 757-764.
- SNYDER J.R., VAN HOOGMOED L. Postoperative care, prevention, and treatment of ileus. *Proc. Ann. Scientif. Meet. Europ. Coll. Vet. Surg.*, 2000, **9**, 157-160.
- TURNER T.A., ADAMS S.B., WHITE N.A. Small intestine incarceration through the epiploic foramen of the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1984, **184**, 731-734.
- VACHON A.M., FISCHER A.T. Small intestinal herniation through the epiploic foramen: 53 cases (1987-1993). *Equine Vet. J.*, 1995, **27**, 373-380.

- VAN HOOGMOED L. Regulation and modulation of gastrointestinal motility with clinical application in horses. *Proc. Ann. Scientif. Meet. Europ. Coll. Vet. Surg.*, 2000, **9**, 138-143.
- WALMSLEY J.P. Subacute colic caused by epiploic foramen incarceration of the small intestine in a horse. *Equine Vet. Educ.*, 1991, **3**, 13-15.
- WHITE N.A., MOORE J.N., TRIM C.M. Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 193-198.
- WHITE N.A. Prognosis of the acute abdomen. *In* : The equine acute abdomen. White II N.A., éd. Philadelphia, Lea & Febiger, 1990.

PURIFICATION OF MYELOPEROXIDASE FROM EQUINE POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES.

**Marianne MATHY-HARTERT¹, Emmanuelle BOURGEOIS¹, Sigrid GRULKE²,
Ginette DEBY-DUPONT^{1,3}, Isabelle CAUDRON², Carol DEBY¹, Maurice LAMY^{1,3},
Didier SERTEYN².**

- ¹ Centre for the Biochemistry of Oxygen, Institut de Chimie, B6a, Université de Liège, Domaine Universitaire du Sart Tilman, 4000 LIEGE, Belgium
- ² Department of Anaesthesia and Surgical Pathology of Large Animals, Institut de Médecine Vétérinaire, B41, Université de Liège, Domaine Universitaire du Sart Tilman, 4000 LIEGE, Belgium
- ³ Department of Anaesthesia and Intensive Care Medicine, University Hospital of Liège, B35, Domaine Universitaire du Sart Tilman, 4000 LIEGE, Belgium

ABSTRACT

Increases of plasma concentrations of neutrophil myeloperoxidase (MPO) can be used as markers of polymorphonuclear leucocytes (PMN) activation in pathological situations (sepsis, acute lung injury, acute inflammation). To develop an assay for measurement of plasma MPO in horses during the above-mentioned infectious and inflammatory conditions, MPO was purified from equine PMN isolated from blood anticoagulated with citrate. PMN were extracted in a saline milieu (0.2 M Na acetate, 1 M NaCl, pH 4.7) to eliminate most of cellular proteins. Pellets were then extracted in the same buffer containing cationic detergent (1% cetyltrimethyl ammonium bromide). The supernatant was further purified by ion exchange chromatography (HiLoad S Sepharose HP column 0.5 x 26 cm, equilibrated with 25 mM Na acetate, 0.2 M NaCl, pH 4.7) with a NaCl gradient (until 1 M). Most of the peroxidase activity of MPO (spectrophotometrically measured by the oxidation of ortho-dianisidine by hydrogen peroxide) was eluted at 0.65 M NaCl. MPO was further purified by gel filtration chromatography (Sephacryl S 200 column 2.6 x 42 cm with 25 mM Na acetate, 0.2 M NaCl, pH 4.7). MPO (specific activity : 74.3 U/mg) was obtained with a yield of 30 % from the detergent extraction supernatant. Electrophoresis (non-reducing conditions) showed 3 bands identified, by comparison with human MPO, (i) the mature tetrameric enzyme (150 kDa) with 2 light and 2 heavy subunits, (ii) the precursor form (88 kDa) and (iii) a form of the heavy subunit without the prosthetic heme group (40 kDa). The mature enzyme and its precursor were glycosylated and possessed peroxidase activity. Equine MPO showed strong similarities with human and bovine MPO, with an absorption peak at 430 nm (Soret peak) characteristic of ferrimyeloperoxidase. Enzymatic activity was pH dependent (optimal value at pH 5.5).

INTRODUCTION

The activation of polymorphonuclear leukocytes (PMN) by endogenous stimuli (complement fragments, cytokines, etc) or by pathogenic micro-organisms is followed by the activation of NADPH oxidase. The activity of this membrane-bound enzyme leads to increased oxygen consumption (the respiratory burst), and is responsible for the production of superoxide anion, the free radical precursor of a series of activated forms of oxygen (1). Stimulation of PMN also leads to degranulation, whereby the contents of the granules are released into the extracellular milieu. These products include myeloperoxidase (MPO), released from the primary granules (2). This enzyme possesses two kinds of enzymatic activities : a peroxidase activity using H_2O_2 and a chlorination activity using Cl^- . Through these activities, MPO catalyzes the production of hypochlorous acid (HOCl) a potent oxidant. Hypochlorous acid and other activated species of oxygen contribute to bacterial destruction within the phagolysosome (2,3), but can also lead to cell and tissue damage (4,5). This is thought to occur when these substances are released into the extracellular milieu following massive activation of PMN, as can be seen during certain pathological processes characterised by an acute inflammatory reaction (4,5).

Endotoxemia is currently the most frequent cause of mortality in horses (6). Among the complex pathophysiologic mechanisms of endotoxemia, extensive activation of PMN could play an important role (7). During intestinal colic, Seahorn et al (8) have demonstrated reduced neutrophil deformability, suggesting that the cells have been activated. To our knowledge, however, there have been no investigations of PMN activation using measurements of plasma concentrations of degranulation products .

In humans, increases in plasma, or other body fluids, concentrations of MPO can be used as markers of neutrophil activation in pathological situations such as sepsis, acute lung injury and acute inflammatory reactions (9,10). If we accept the hypothesis that, in the horse, as in humans, increases in plasma levels of MPO may reflect PMN activation, it would be useful to develop an assay for equine MPO, in order to follow the time course of activation of these cells during infectious and inflammatory conditions. The preliminary phase of this project required purification and characterisation of MPO from equine neutrophils.

No purification technique for equine MPO has yet been reported. On the other hand, the technique for purification of the human enzyme is well established, and the pure protein is well characterized. It is a tetrameric protein (150 kDa), with two light subunits, and two glycosylated heavy subunits bound to a prosthetic heme group (11, 12). Three isoforms of human MPO have been isolated by ion-exchange chromatography (13); all have the same light subunit (15 kDa), but differences in their heavy subunits (molecular masses of 60, 59, and 57 kDa respectively) are responsible for these isoforms (14, 15). Subunits of 88, 39, 25 kDa have also been described (14,16).

We initially followed the protocol developed for the purification of the human enzyme (17) ; because of difficulties encountered during application of the protocol, we adapted the procedure for the isolation of equine MPO. At the end of the purification process, we compared the biological activities and the spectral characteristics of the human and equine products.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Analytical grade NaCl, phosphate salts, Na acetate, NaHCO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, EDTA, hydrogen peroxide (perhydrol), dithiothreitol, Folin Ciocalteu reagent and Schiff staining compounds (periodic acid, Na pyrosulfite, acetic acid) were from Merck (Darmstadt, Germany). Ortho-dianisidine, sodium diatrizoate, monochlorodimedon, cetyltrimethyl ammonium bromide (CETAB) and bicinchonic acid kit were from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Ficoll-Paque, Hiload S Sepharose HP and Sephacryl S-200 columns (Fast Protein Liquid Chromatography - FPLC), sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis gels (SDS Excel Gel, gradient 8-18), protein markers and Coomassie Brilliant Blue were from Pharmacia Biotech (The Netherlands). Human MPO was purified in our laboratory as described (17).

MPO enzymatic assay

MPO peroxidase activity

For each purification step, the presence of MPO was verified by measuring enzymatic MPO activity, while the protein concentration was determined using the Folin-Ciocalteu procedure (for samples without detergent) or the bicinchonic acid procedure (Sigma kit) (for samples with detergent). Peroxidase activity of MPO was assayed at 25°C by measuring the increase of absorbance at 460 nm due to the oxidation of ortho-dianisidine (Perkin-Elmer Lambda 15 UV-Visible spectrophotometer) (18). The MPO-containing sample (50 µL) was added to 3 mL of Sörensen buffer (pH 5.5) containing 50 mM ortho-dianisidine, and the reaction started by addition of H₂O₂ to a final concentration of 0.15 mM. One unit of activity was defined as the amount of MPO increasing the absorbance by 1 optical density unit per minute at 460 nm.

MPO chlorination activity

The chlorination activity of MPO was measured by following the conversion of monochlorodimedon to dichlorodimedon (19). The measurement of this chlorination activity was used for characterization of the pH dependence of MPO activity. The sample containing MPO (3 to 5 µg) was incubated in a final volume of 3 mL of buffer containing 50 mM NaCl and 2.5 µM monochlorodimedon. The reaction was started by the addition of 0.1 mM H₂O₂, and the decrease of absorbance at 290 nm was measured for 1 minute. One unit of activity was defined as the amount of MPO which produced an absorbance decrease of 1 optical density unit per minute. The pH dependence of MPO was studied in the pH range of 3.0 to 7.0. Two different buffers were used : a Sörensen phosphate buffer (pH 7.0 to 5.0) and an acetate buffer (Na acetate 50 mM, pH 4.5 to 3.0).

PMN isolation

Equine PMN were isolated from 30 L of blood anticoagulated with citrate . After centrifugation (2,500 g, 15 min), the plasma was discarded. To the remaining erythrocytes and leucocytes, 0.5 vol Ficoll-Paque (5.7 % Ficoll 400; 9 % sodium diatrizoate; 0.1 % EDTA) was added, and the PMN were isolated by density gradient centrifugation (650 g, 15 min). The supernatant containing the PMN was diluted with 0.5 vol 0.9 % NaCl and centrifuged (100 g,

10 min). PMN were further purified by lysis of the contaminating erythrocytes with a hypotonic solution (0.15 M NH_4Cl ; 0.1 mM EDTA; 10 mM NaHCO_3 ; pH 7.4). After centrifugation (1,500 g, 15 min), the PMN were collected and stored at -20°C .

MPO purification

This purification was performed following the technique that we used for the purification of human MPO (17), adapted from Bakkenist et al (20) and Matheson et al (21).

PMN extraction

Frozen cells were suspended in ice cold acetate buffer (extraction buffer : 0.2 M Na acetate; 1 M NaCl; pH 4.7) and disrupted with a motor driven homogenizer at 3,000 rpm (Ultra-Turrax; Janke and Kunkel). Supernatant was collected by centrifugation (9,000 g, 15 min). This extraction procedure was repeated twice and the supernatants were pooled (extract 1). Another extraction was carried out using the pellet with the same extraction buffer to which was added 1 % CETAB (extract 2).

Dialysis and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation

Extract 1 was dialysed at 4°C overnight against 0.2 M acetate buffer (pH 4.7) containing a low salt concentration (0.1 M NaCl). This procedure was used in the purification of human MPO to eliminate cathepsin G and elastase, which precipitated at NaCl concentrations ≤ 0.15 M, while human MPO was recovered in the supernatant (21).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation (at 55 % saturation) was then performed as for human MPO (11). After 1 h of stirring at 4°C , the solution was centrifuged (13,000 g, 20 min) and the supernatant was collected.

Chromatographic steps

After dialysis of extract 2 in loading buffer (25 mM Na acetate, 0.2 M NaCl, pH 4.7), MPO was purified by two chromatographic steps, ion exchange followed by gel filtration chromatography (Basic FPLC System - Pharmacia Biotech - Belgium) (17). The dialysed solution containing MPO was loaded on an Hiloal S Sepharose HP ion exchange column (0.5 x 26 cm) equilibrated with loading buffer. Flow rate was maintained at 2 mL/min and fractions of 4 mL were collected. The presence of proteins was monitored in the column effluent by UV

absorbance at 280 nm. Unfixed proteins were eluted in a large initial peak, and after the absorbance returned to baseline, a NaCl gradient was applied in 2 steps: 0.2 to 0.5 M in 10 mL followed by 0.5 to 1 M in 140 mL. The fractions containing the highest MPO activity were loaded on a Sephacryl S-200 gel filtration column (2.6 x 42 cm) and eluted with loading buffer at a flow rate of 2 mL/min; fractions of 4 mL were collected.

Electrophoresis

After the last chromatographic step, the MPO-rich fractions were pooled and concentrated. The purity of MPO was then assayed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (ExcelGel SDS, gradient 8-18). Both non-reduced and reduced (by 5 mM dithiothreitol) samples were assayed. Gels were stained either for protein (with Coomassie Brilliant Blue), for MPO peroxidase activity (by incubation in 50 mM ortho-dianisidine buffer, in the presence of 0.15 mM H₂O₂) (see above), or for glycoprotein (by periodic acid-Schiff staining) (22).

Characterization of equine MPO : comparison with human MPO

Equine MPO was compared with the human enzyme for its spectral characteristics (Perkin-Elmer Lambda 15 UV-Visible spectrophotometer) and for the pH dependence of its chlorination activity. The chlorination activity was measured in the pH range of 7.0 to 3.0 (see above).

The human MPO used for this comparison was purified in our laboratory following a previously described technique (17). Briefly, human PMN were isolated from buffy coats by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque). After homogenization of the cells in ice cold 0.2 M Na acetate buffer, 1M NaCl (pH 4.7), the supernatant was dialyzed for elimination of cathepsin G and elastase by precipitation at low salt concentration. The supernatant of the dialysis was added with solid (NH₄)₂SO₄ until 55% saturation providing a new supernatant rich in MPO activity. After dialysis, this last supernatant was further purified by 2 chromatographic steps : ion exchange chromatography on Hiload S Sepharose HP followed by a gel filtration chromatography on Sephacryl S-200.

RESULTS

Equine MPO purification

Saline extraction

The extraction performed in saline buffer, as for human MPO, provided an MPO rich pellet which was frozen at -20°C until further processing and a supernatant (extract 1) which contained relatively little MPO activity (315 U) compared to the yield obtained by identical treatment of human PMN (17). Dialysis of this extract 1 caused precipitation of equine MPO, and left only 51 U of activity in the supernatant. This precipitation was not found in the purification of human MPO, which stayed in solution under identical circumstances. Further treatment of the supernatant of dialysis with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (55 % saturation) led to a complete precipitation of equine MPO. During the purification of human MPO, this precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ led to a three-fold increase in the specific activity of MPO, by eliminating precipitated contaminating proteins. This procedure appeared thus inapplicable to equine MPO, and at this point, we stopped this purification method.

Purification from the pellets of saline extraction

The pellet obtained after the initial extraction of PMN in saline buffer was re-extracted with the same buffer, after addition of 1 % CETAB (extract 2). This treatment yielded 588 U MPO, with a specific activity of 3 U/mg. The extract was dialysed against the loading buffer of the ion-exchange column, then submitted to chromatography on a cationic exchange resin (S Sepharose). Upon loading the column, the non-bound proteins eluted immediately, before applying the linear gradient of NaCl. After application of this NaCl gradient, 3 peaks of proteins were obtained. MPO activity was absent from the first peak, weak in the second (< 1 U/mL), and high in the third peak. This peak eluted at a concentration of 0.65 M NaCl and contained 288 U of MPO (specific activity of 19 U/mg). The fractions corresponding to this peak were grouped and used for the gel filtration step. The chromatographic profile found after this step revealed 2 protein peaks that eluted at volumes of 120 and 150 mL respectively. As with human

MPO, only the second peak showed enzymatic activity. After concentration of the active fractions, we obtained 176 U of pure enzyme, with a specific activity of 74.3 U/mg.

Characterisation of the pure enzyme

Electrophoretic analysis

Electrophoresis of the equine MPO showed 3 bands with molecular masses of 150, 88, and 40 kDa (figure 1, lane 2). The band at 88 kDa was the densest. The MPO was treated with dithiothreitol (5mM) prior to loading onto the gel, with an aim to breaking internal disulphide bridges and revealing the subunit structure of the enzyme. In this case the band at 88 kDa remained, while the bands at 150 and 40 kDa disappeared; a weakly staining band also appeared at a molecular mass of 62 kDa (figure 1, lane 3). The peroxidase activity (defined as coloration of the gel with orthodiansidine in the presence of H₂O₂) showed activity at the 150 and 88 kDa bands under non-reducing conditions. Schiff coloration, which indicates glycosylation, was positive for these same 150 and 88 kDa bands.

Spectroscopic analysis and comparison with human MPO

Native human MPO (containing an Fe³⁺ ion) presents an absorption peak at 430 nm, corresponding to the Soret peak, characteristic of heme compounds (23). The absorption spectrum of equine MPO shows the same peak. Indeed, the spectra of the human and equine MPO are superimposable (figure 2).

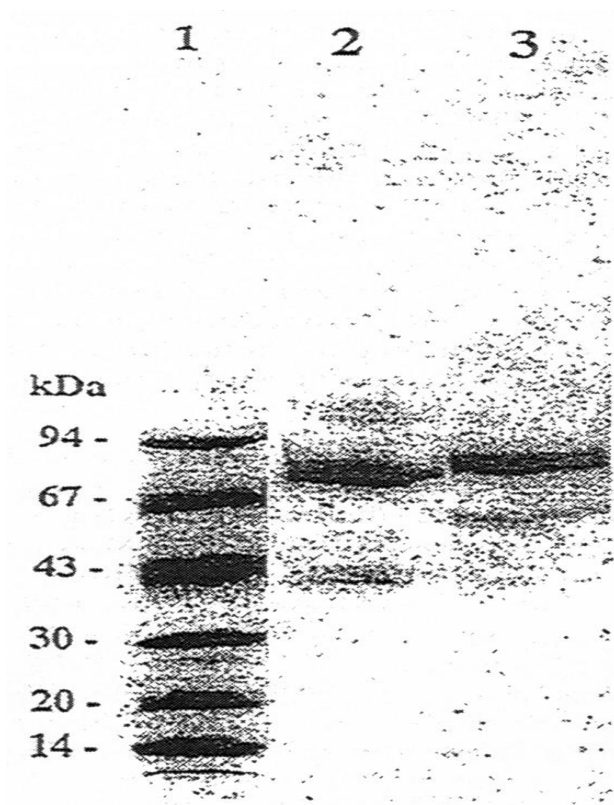
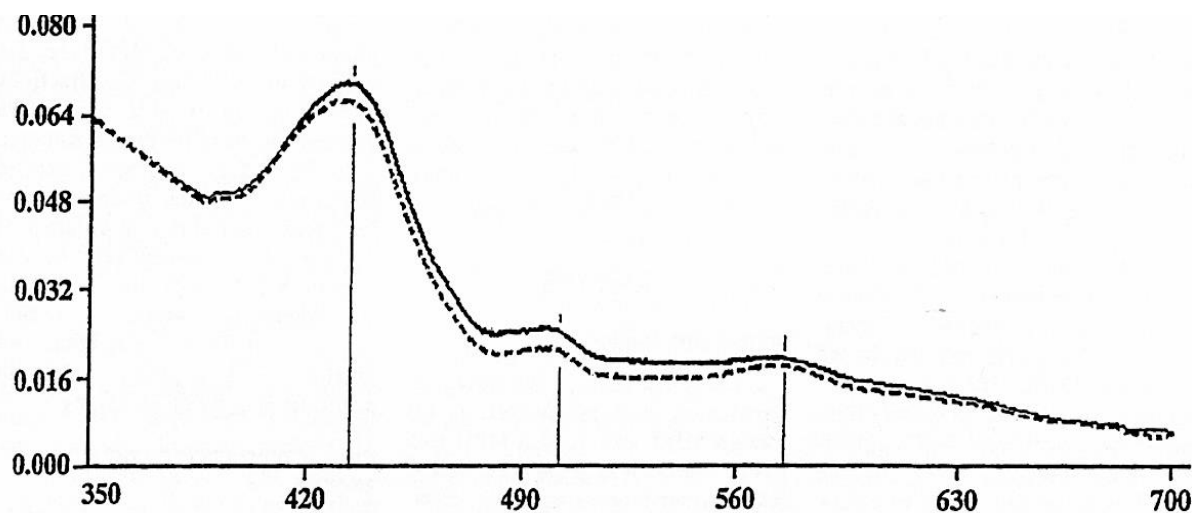


Figure 1
 Analysis of purified equine MPO by SDS polyacrylamide gel (8-18 % gradient gel) electrophoresis. Lane 1: molecular mass markers; lane 2: MPO after gel filtration chromatography; lane 3: same as 2 but MPO was reduced by 5 mM dithiothreitol.

Figure 2.
 Absorbency spectrum of equine MPO

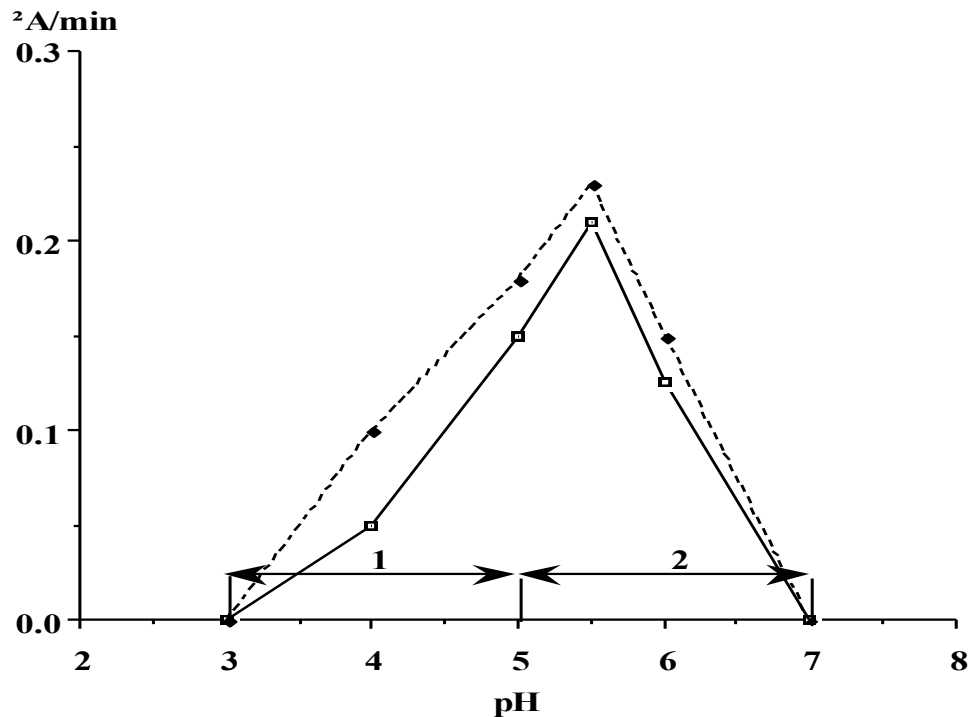
(—) compared with human MPO (- - -)



Analysis of enzymatic activity

MPO specifically catalyses the formation of hypochlorous acid, obtained by oxidation of chloride anion in the presence of H_2O_2 . This activity can be followed spectrophotometrically by the chlorination of monochlorodimedon (see methods). Human MPO shows a pH dependence of its enzymatic activity, with a maximum seen at pH 5.5 (23). Figure 3 shows a similar pH-dependent activity profile for the equine enzyme.

Figure 3. pH-dependence of enzymatic activity of equine MPO (—) compared with human MPO (- - -). 1: Na citrate buffer; 2: Phosphate buffer.



DISCUSSION

To the best of our knowledge, no technique for the purification of equine MPO from neutrophils isolated from whole blood has previously been published. This enzyme has been isolated from human, dog (24) and cow (25) neutrophils. The techniques used for the canine and bovine enzymes are very similar to those used for human MPO, and yield pure preparations with the similar characteristics (24,25). Because we had already purified human MPO (17), we initially decided to use a similar protocol. It quickly became apparent that the equine enzyme behaved differently than its human counterpart. Saline extraction of equine PMN yielded a supernatant (extract 1) containing little peroxidase activity (315 U, 0.69 U/mg); this is in distinct from the human enzyme, which, given an equal starting volume of blood, yielded 800 U of activity in the first supernatant (17). In an attempt to reduce the salt concentration in the supernatant, dialysis against 0.1 M NaCl precipitated almost all of the MPO activity found in this fraction (264 U or 83.8 %). During the purification of human MPO, this step results in the selective precipitation of cathepsin G and elastase (21). After treatment of the dialysed supernatant with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, equine MPO precipitated at 55 % saturation. This behaviour

(precipitation in weak saline solution and in the presence of relatively low concentrations of ammonium sulphate) would appear to indicate greater hydrophobicity of the equine, relative to the human, enzyme.

Given the low yields and the problems seen with strict application of the human purification protocol, we decided to re-solubilize the precipitate obtained after saline extraction in a detergent-containing solution (extract 2). Starting with this extract, which contained 588 U of MPO, we were able to proceed to chromatographies with no particular technical problems, with acceptable yields of pure enzyme (176 U, or 30 %), and with reasonable specific activity (74.3 U/mg); this corresponded to a purification factor of 24.8 relative to crude extract 2.

Polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions, showed 3 different bands, corresponding to molecular masses of 150, 88 and 40 kDa. Compared to published data for human MPO, the 150 and 88 kDa bands would represent, respectively, mature tetrameric MPO and its precursor (11,13,16). These 2 forms are glycosylated and possess enzymatic activity, as shown by the peroxidase reaction carried out on the electrophoretic gels. The equine enzyme had a much higher concentration of precursor forms (88 kDa) than of mature forms (150 kDa) compared to human MPO. This could help to explain the differences in behaviour between the equine and human forms of MPO (greater hydrophobicity and one isoform of the horse enzyme). The 40 kDa band is also seen under non-reducing conditions with human MPO (14,15,26,27). Its precise nature has not yet been characterised, but may be a form of heavy subunit without the prosthetic heme group (15,27). As with the human enzyme, this form of MPO does not give a positive peroxidase reaction.

Electrophoresis of the equine MPO after reduction gives 2 bands at 88 and 62 kDa; the first of these corresponds to precursor that has not been affected by the treatment with reducing agent. This treatment cleaves human MPO into heavy and light subunits, and we expected to find the same electrophoretic pattern with the equine enzyme. It was therefore surprising to note the absence of a band at 15 kDa. This may, however, be explained by the relative paucity of mature enzyme on the gel. On the other hand, the disappearance of the band at 40 kDa caused by treatment with reducing agents is in accordance with literature data concerning human MPO (15,27).

A complementary study wherein the spectral characteristics of pure human and equine MPO were compared showed identical properties, characteristic of ferrimyeloperoxidase, including a major absorption peak at 430 nm (Soret peak), a minor one at 580nm and a shoulder

at 620 nm (23). The enzymes from both species showed identical pH-dependent behaviour, with optimal activity at a pH of 5.5.

Data from the literature also allow comparison of equine with bovine MPO. Bovine MPO shows strong similarity with the human enzyme, both as concerns their enzymatic properties as well as by the existence of 3 isoforms with similar amino acid compositions (25). We thus find that the equine enzyme possesses the same similarities and differences, relative to bovine MPO, as it does relative to human MPO.

We thus developed a protocol which allows purification of MPO from equine PMN following 2 extractions and 2 chromatographic steps. Extraction in a saline milieu leads to the loss of one third (315 U) of the MPO initially present, but eliminates most of the contaminating cellular proteins into the supernatant. The majority of the MPO is thus found in the pellet (580 U), which can then be extracted with detergent. The supernatant of this step can immediately be applied to an ion exchange resin, followed by gel filtration chromatography to eliminate residual protein contaminants. MPO is thus isolated with a yield of 30 % (176 U) from the detergent-extraction supernatant.

The purified enzyme shows the same electrophoretic characteristics as human MPO, but with a higher ratio of precursor to mature enzyme. Its spectral properties and pH dependency are also the same as those of human MPO. Now that equine MPO has been purified, we plan on developing a radio-immunologic assay which can be applied to biological samples, and which could be used on plasma to detect activation and degranulation of PMN under different circumstances.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Dr. Gary Hartstein for his assistance in English language. This work was supported by the Fund of Medical Scientific Research (Belgium) grant 3.4554.93.

REFERENCES

1. KLEBANOFF SJ. Oxygen metabolites from phagocytes. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman MD, eds. *Inflammation : Basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press, Ltd, 1992: 391-444.

2. CLARK RA. Extracellular effects of the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *Adv Inflamm Res* 1983; 5: 107-146.
3. KLEBANOFF SJ, HAMON CB. Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. *J Reticuloendothel Soc* 1972; 12: 170-196.
4. WEISS SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320: 365-376.
5. FUJISHIMA S, AIKAWA N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med* 1995; 21: 277-285.
6. MOORE JN, MORRIS DD. Endotoxemia and septicemia in horses : experimental and clinical correlates. *J Am Vet Med Ass* 1992; 200: 1903-1914.
7. GREEN EM, ADAMS R. New perspectives in circulatory shock : pathophysiologic mediators of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. *J Am Vet Med Ass* 1992; 200: 1834-1841.
8. SEAHORN TL, GAUNT SD, BERRY C. Blood cell deformability in horses with intestinal colic. *Am J Vet Res* 1994; 55: 321-324.
9. WEILAND JE, DAVIS WB, HOLTER JF, MOHAMED JR, DORINSKY PM, GADEK JE. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:218-225.
10. FAYMONVILLE ME, PINCEMAIL J, DUCHATEAU J, PAULUS JM, ADAM A, DEBY-DUPONT G, DEBY C, ALBERT A, LARBUISSON R, LIMET R, LAMY M. Myeloperoxidase and elastase as markers of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102:309-317.
11. ANDREWS PC, KRINSKY NI. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymically active hemi-myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1980; 256: 4211-4218.
12. ANDERSEN MR, ATKINS CL, EYRE HJ. Intact form of myeloperoxidase from normal human neutrophils. *Arch Biochem and Biophys* 1982; 214 : 273-283.
13. PEMBER SO, FUHRER-KRÜSI SM, BARNES KC, KINKADE JM. Isolation of three native forms of myeloperoxidase from human polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 1982; 140 : 103-108.
14. MIYASAKI KT, WILSON ME, COHEN E, JONES PC, GENCO R. Evidence for and partial characterization of three major and three minor chromatographic forms of human neutrophil myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 751-764.
15. TAYLOR KL, GUZMAN GS, POHL J, KINKADE JM. Distinct chromatographic forms of human hemi-myeloperoxidase obtained by reductive cleavage of the dimeric enzyme. *J Biol Chem* 1990; 265: 1538-1546.

16. PEMBER SO, SHAPIRA R, KINKADE JM. Multiple forms of myeloperoxidase from human neutrophilic granulocytes: evidence for differences in compartmentalization. Enzymatic activity, and subunit structure. Arch Biochem Biophys 1983; 221: 391-403.
17. MATHY-HARTERT M, DEBY-DUPONT G, MELIN P, LAMY M AND DEBY C. Bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* is acquired by cultured human monocyte-derived macrophages after uptake of myeloperoxidase. Experientia 1996; 52: 167-174.
18. FREEHOLD NJ. Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corp 1972; 43-45.
19. HAGER LP, MORRIS DR, BROWN FS, EBERWEIN H. Chloroperoxidase utilisation of halogen anions. J Biol Chem 1966; 241: 1769-1777.
20. BAKKENIST ARJ., WEVER R, VULSMA T, PLATH H, VAN GELDER BF. Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leucocytes. Biochim Biophys Acta 1978; 524: 45-54.
21. MATHESON NR, WONG PS, TRAVIS J. Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. Biochemistry 1981; 20: 325-330.
22. SEGREST JP, JACKSON RL. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl/sulfate. Methods Enzymol 1972; 28: 54-63.
23. JACQUET A, DEBY C, MATHY M, MOGUILEVSKY N, DEBY-DUPONT G, THIRION A, GOORMAGTIGH E, GARCIA-QUINTANA, BOLLEN A AND PINCEMAIL J. Spectral and enzymatic properties of human recombinant myeloperoxidase: comparison with the mature enzyme. Arch Biochem Biophys 1991; 291: 132-138.
24. HARRISON JE, PABALAN S, SCHULTZ J. The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase. Biochem Biophys Acta 1977; 493:247-259.
25. COORAY R, PETERSON CGB, HOLMOBERG O. Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules. Vet Immunol Immunopathol 1993; 38: 261-272.
26. NAUSEEF WN, ROOT RK, MALECH HL. Biochemical and immunologic analysis of hereditary myeloperoxidase deficiency. J Clin Invest 1983; 71: 1297-1307.
27. OLSEN RL, LITTLE C. Studies on the subunits of human myeloperoxidase. Biochem J 1984; 222: 701-709.

**EQUINE NEUTROPHIL MYELOPEROXIDASE IN PLASMA :
DESIGN OF A RADIOIMMUNOASSAY AND FIRST RESULTS
IN SEPTIC PATHOLOGIES.**

**G. Deby-Dupont^{1,2}, S. Grulke^{1,3}, I. Caudron^{1,3}, M. Mathy-Hartert¹,
H. Benbarek³, C. Deby¹, M. Lamy^{1,2}, D. Serteyn^{1,3}.**

1. Centre for the Biochemistry of Oxygen, Institut de Chimie, B6a, Université du Sart Tilman, 4000, Liège, Belgique.
2. Department of Anaesthesia and Intensive Care Medicine, Centre Hospitalier Universitaire, B35, Université du Sart Tilman, 4000, Liège, Belgique.
3. Department of General Anaesthesia and Surgical Pathology of Large Animals, Institut de Médecine Vétérinaire, B 41, Université du Sart Tilman, 4000, Liège, Belgique.

Abstract

The strangulated intestinal pathologies of horses are accompanied by a local activation of the neutrophils, that can be revealed by measuring the tissular enzymatic activity of the granulocytic enzyme myeloperoxidase (MPO). To estimate the possible spreading of this neutrophil activation to the systemic circulation, we designed a radioimmunoassay (RIA) for equine neutrophil myeloperoxidase (MPO) (EC 1.11.1.7) using a specific rabbit antiserum. MPO was labelled with 1 mCi ^{125}I by a technique of self-labeling in the presence of 10^{-4} M hydrogen peroxide. The RIA was performed by incubation of 100 μl diluted antiserum, 100 μl labelled MPO ($\pm 30,000$ cpm) and 100 μl of the reference molecule (unlabelled MPO) solution or the unknown sample, at room temperature for 18 h. The antibody-antigen complexes were isolated by double antibody precipitation. The sensitivity of the RIA was 2 ng/ml. The RIA showed good precision and accuracy with intra- and interassay coefficients of variation ≤ 6 and 8 % respectively, for MPO concentrations ranging from 2 to 60 ng/ml. The best sampling technique for MPO measurement in plasma was to collect blood into EDTA, what allowed to obtain a plasmatic value stable with time. The mean MPO value in normal horses was 69.5 ± 19.4 ng/ml in EDTA anticoagulated plasma (n = 48). The stress of transport and anaesthesia did not modify the mean plasmatic value of MPO. No significant increase of plasma MPO was observed in 17 horses submitted to surgery for pathologies without systemic impact. But, in 25 horses with obstructive intestinal pathologies, persitent abnormal MPO concentrations were measured (until 740 ng/ml).

Keywords: equine myeloperoxidase, neutrophil, radioimmunoassay, iodination, plasma, horse, intestinal strangulation.

1. Introduction

The chemotaxis and the stimulation of the polymorphonuclear leucocytes (PMN) are induced by endogenous factors (cytokines, complement fragments, lipid mediators...) and by many exogenous agents, such as bacterial peptides and endotoxins, which act after binding to specific proteins and by stimulation of the cytokines secretion by monocytes and macrophages (Wright et al., 1990; Fujishima and Aikawa, 1995). This stimulation of PMN results in a sudden increase of their oxygen consumption (the respiratory burst), with the production of reactive oxygen species (Klebanoff, 1992; Hurst, 1993). The stimulation of PMN also results into the degranulation and the release of hydrolytic and proteolytic enzymes from their granules. Myeloperoxidase (MPO) is a specific haemic enzyme of the azurophilic granules of the neutrophils (Odell and Segal, 1988; Klebanoff, 1992). The reactive oxygen species and the enzymes normally act inside the phagolysosome for the destruction of the ingested organisms, but they may be poured out in the extracellular milieu and contribute to the damage or destruction of the neighbouring cells and tissues when the stimulation of PMN becomes uncontrolled (Weiss, 1989).

When excessive stimulation of PMN occurs, MPO contributes to the cell and tissue damage, by producing oxidant compounds, such as native chlorine and hypochlorous acid (HOCl), which is synthesized from chloride anion (Cl^-) and hydrogen peroxide (Test and Weiss, 1986; Hazen et al., 1996). HOCl is a strong oxidant molecule that can chlorinate amino acids, peptides and proteins, and oxidize thiol functions of many proteins (Deby-Dupont et al., 1994). In man, increased concentrations of MPO in plasma or other biological fluids are taken as a marker of PMN activation and degranulation in inflammation (sepsis, acute lung injury, systemic inflammatory reaction syndrome, after cardiac surgery...) (Weiland et al., 1986; Eklund et al., 1988; Pincemail et al., 1991; Faymonville et al., 1991).

Equine pathologies such as laminitis or intestinal strangulation with sepsis could be linked to the activation of neutrophils, starting locally and extending to the systemic circulation (Morris, 1991; Moore and Morris, 1992; Green and Adams, 1992). The measurement of the local enzymatic activity of myeloperoxidase has been used as a tracer to quantitative neutrophil sequestration in tissue (Yarbrough et al., 1994; Nishizawa et al., 1996), but this activity can not be measured in plasma since MPO, when secreted in the external milieu is inactivated (King et al., 1997). To demonstrate the activation of PMN in the systemic blood of horses with intestinal strangulation pathologies, we purified equine neutrophil MPO (Mathy-Hartert et al., 1998), and

designed a radioimmunological technique for measuring the variations of the MPO concentrations in plasma. We described here this new technique, and reported the first applications to normal and pathological plasma samples.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Phosphate salts, Na chloride, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), Na acetate, Na citrate, Na azide, hydrogen peroxide (H₂O₂), Tween and microcrystalline cellulose were from Merck (analytical grade). Polyethyleneglycol 6000 was from Fluka. Cetyl trimethyl ammonium bromide, Freund's adjuvant, poly-L-lysine hydrobromide and heparin were purchased from Sigma. Ficoll-Paque, Percoll, Hiload S Sepharose HP and Sephacryl S 200 columns, Sephadex G 10 were from Pharmacia. Bovine serum albumin (BSA) was from Boehringer . ¹²⁵Iodine (iodination grade, Na¹²⁵I) was from Amersham. Normal rabbit serum and sheep antiserum against rabbit gamma-globulins were purchased from the Laboratory of Hormonology, Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgium. Animal housing and immunization were performed at the Laboratory of Hormonology, Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgium.

2.2. Purification of equine MPO

MPO was extracted from equine polymorphonuclear leucocytes isolated from whole blood by sedimentation on Percoll density gradient (Pycock et al., 1987). The purification was performed following a previously described technique (Mathy-Hartert et al., 1998). Briefly, packed neutrophils were homogenized in 0.2 M Na acetate buffer (pH 4.7), 1 M NaCl, added with protease inhibitors. After centrifugation, most of the granulocytic proteins were discarded in the supernatant. The pellets were extracted by detergent (cetyltrimethylammonium bromide), and the extract was dialyzed before cationic ion exchange chromatography (Hiload S Sepharose) with NaCl gradient, followed by gel filtration chromatography on Sephacryl S-200 (elution with NaCl-acetate buffer). The purity of MPO was assessed by electrophoresis and by enzymatic assays in comparison with human and bovine MPO.

2.3. Immunization

Antisera were raised in rabbits by intradermic injection with 100 µg of pure equine MPO dissolved in 0.05 M phosphate buffer, NaCl 0.15M, at pH 7.4, emulsified with 1 ml complete Freund's adjuvant (Deby-Dupont et al, 1991; Pincemail et al, 1991). Booster injections were given at 15 days intervals with 50 µg of emulsified MPO. Blood samples were collected at the marginal vein of the ear, 12 days after each booster injection, and allowed to clot at room temperature. The titer of the isolated antiserum was estimated by binding of a fixed amount of labelled antigen (¹²⁵I MPO) to 100 µl of successive dilutions of the antiserum. After the last booster injection the animals were exsanguinated under anaesthesia by cardiac puncture. The titer of the final antiserum was defined as the highest antiserum dilution still binding 30 % of labelled antigen .

2.4. Labeling

2.4.1. Iodination procedure

Equine MPO was labelled by the self-labeling technique, as previously described for human MPO (Deby-Dupont et al., 1991). This technique uses the ability of MPO to fix halide anions in the presence of H₂O₂ to produce halogenated organic molecules. Five ng of equine MPO in 10 µl of 0.5 M Na-acetate buffer at pH 5.5 were added to 1 mCi (10 µl) N¹²⁵I at pH 10 (specific activity ±17 Ci/mg), and 2 additions of 10 µl of 8.8 10⁻⁴ M H₂O₂ were made at 3 min interval. After a last 3 min period, the reaction was stopped by dilution with 300 µl of Na-acetate buffer.

2.4.2. Purification of radioiodinated MPO

The labelled MPO was then isolated from free ¹²⁵I and degraded material by gel filtration chromatography on a Sephadex G10 column (0.9x15 cm). Elution was made in 3 steps : firstly with ± 15 ml 0.05M phosphate buffer at pH 7.4, added with 0.5 % BSA and 0.05 % Na azide, followed by ± 6 ml 0.5 M Na acetate buffer at pH 5.5, and finally with ± 20 ml of the first elution buffer added with 0.1% poly-L-lysine hydrobromide. Fractions of 1 ml were collected and counted (γ counter RIASTAR Packard). The fractions containing the undegraded labelled MPO were pooled and used as tracer (labelled antigen) in the immunological assays. The specific activity was determined by the method of self displacement by labelled antigen in competition with unlabelled antigen.

2.5. RIA procedure

All reagents were dissolved in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.9 % NaCl, 0.5 % BSA and 0.05 % Na azide (incubation buffer). In the assay tubes were added 100 μ l of 125 I-MPO (0.5 ng representing about 30,000 cpm) with 1 % normal rabbit serum, 100 μ l of rabbit anti-MPO serum (initial dilution of 1/40,000), and either 100 μ l of incubation buffer or 100 μ l of increasing concentrations of unlabelled standard MPO (from 2 to 200 ng/ml) or 100 μ l of unknown sample. The tube with buffer alone (no standard MPO) was used to assess the maximal binding of tracer to the antiserum in the absence of unlabelled antigen (B_0). Tubes were incubated for 18 h at room temperature. The non specific binding of tracer was measured by the incubation of 125 I-MPO in the absence of anti-MPO serum. Separation of antibody bound to antigen from free antigen was achieved by using a polyethylene glycol accelerated second antibody precipitation: 1 ml of incubation buffer containing 0.5 % Tween, 6 % polyethylene glycol 6000, 0.2 % microcrystalline cellulose and 0.5 % sheep anti-rabbit gammaglobulin serum, was added to each tube. After an incubation of 20 min at room temperature, antigen-antibody complexes were sedimented by centrifugation (20 min at 2,000g). The supernatant was discarded and the tubes counted. The results were expressed as the ratio between the amount of tracer bound to antibody in the presence (B) and in the absence (B_0) of unlabelled MPO, it is B/B_0 expressed in %. The ratios B/B_0 calculated for the unknown samples were reported on the standard curve to obtain the MPO value in ng/ml.

2.6. Characteristics of RIA : specificity, sensibility, precision, accuracy and reproducibility

The cross-reactivity of the antiserum was tested with equine plasma proteins (albumin, haemoglobin), and with the total protein contents of equine platelets, lymphocytes, monocytes, eosinophils and neutrophils. These protein contents were obtained by homogenization of the cells after isolation. Sensitivity was defined as the minimum amount of unlabelled MPO which caused a reduction in the percent of tracer bound to antibody, greater than twice the standard deviation of 10 determinations of B_0 . The precision was estimated by the coefficient of variation calculated for 10 determinations of each standard MPO concentration. Accuracy was estimated by the recovery of known amounts of MPO (10, 20, and 50 ng/ml) added to equine plasma

samples. Reproducibility was measured by the coefficient of variation calculated for at least 5 determinations of the same sample within or between assays.

2.7. Normal and pathological values of MPO in blood

2.7.1. Effects of the anticoagulation technique

Blood samples were obtained from 15 healthy warmblood horses, aged from 5 to 22 years (mean age: 12.7 years; 12 geldings, 3 mares). The blood was drawn from the jugular vein into a dry tube or into an anticoagulated tube (EDTA : 1 mg/ml, heparin : 12.5 IU/ml or 1ml 0.15 M Na citrate for 9 ml of blood). In dry tube, the blood was allowed to clot (4 h) at room temperature. The blood was centrifuged for 10 min at room temperature at 1,000 g. The plasma and serum were frozen at -20°C until assayed. In order to study the effects of a delay between blood sampling and centrifugation, blood samples taken into EDTA, heparin or citrate, were centrifuged 30 or 210 minutes after sampling.

2.7.2. Mean normal values of MPO in blood

Blood samples were drawn on EDTA (1mg/ml) from 48 healthy warmblood horses (mean age: 12.3 years; 11 mares, 37 geldings) with a normal clinical investigation, fed and bred in the same conditions, with 1 to 2 h of daily training. Plasma was isolated by immediate centrifugation and frozen at -20°C until assayed.

2.7.3. Effects of daily variations, transport conditions, anaesthesia and surgery on blood MPO

The daily variations were studied on blood drawn every 2 hours during 12 hours from 3 healthy warmblood horses (one 6 years old gelding, and two 17 years old mares). The effects of transport, anaesthesia, and surgical stress were studied in 17 warmblood horses (8 geldings, 5 stallions and 4 mares, mean age : 6 years). Surgery was performed for pathologies without systemic impact (laryngoplasty, arthroscopy, castration). The protocol of anaesthesia was always identical, and was a tranquillization with acepromazine and xylazine, followed by an induction of anaesthesia by glycerol ether gaïacolate/penthotal, and an anaesthesia maintenance by halogenated drugs. Blood was drawn before surgery, at starting of anaesthesia when the stabilization of cardiovascular parameters was reached, after 1h of anaesthesia, at end of anaesthesia when halogenated drug administration was stopped, 1 hour, 4 hours and 24 hours

after the end of anaesthesia. The blood samples were drawn on EDTA (1mg/ml), immediately centrifuged, and the plasma was frozen at -20°C until assayed.

2.7.4. Effects of intestinal pathologies on blood MPO

Blood samples were obtained from 25 warmblood horses (11 mares, 3 stallions and 11 geldings; mean age : 8 years) with obstructive intestinal pathologies : 8 obstructions of large (7) or small (1) intestine, 17 strangulations of large (8) or small (9) intestine, with severe systemic repercussions. The blood was drawn (on EDTA 1mg/ml, immediate centrifugation) at the arrival of the horse at the veterinary intensive care unit, during surgery, directly after surgery and at 4-hourly intervals after the end of surgery.

3. Results

3.1. Purification of equine MPO

After the last purification step, we obtained 2.3 mg of equine neutrophil MPO from 30 L of blood. By SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, we found that MPO was pure ($\geq 98\%$), and characterized by 3 bands of different intensity corresponding to the mature tetrameric enzyme (150 kDa), to the precursor form of the enzyme (88 kDa) and to the heavy subunit (40 kDa). After reducing treatment, we identified 2 bands (62 and 88 kDa) corresponding to the hemi-enzyme (association of the light and heavy subunits) and the precursor form. The pure enzyme had a specific activity of 74.3 U/mg. The enzymatic activity was pH-dependent (optimal pH: 5.5), with characteristics similar to that of human MPO (Mathy-Hartert et al., 1998).

3.2. Immunization

From the 2 rabbits we obtained 2 antiserums with similar affinity and specificity for equine MPO. They could be used at the initial dilution of 1/40,000, binding 25 to 35 % of the labelled

antigen after 18 h of incubation at room temperature, with a non specific binding not exceeding 5 %. The binding of labelled antigen remained maximal until 30 h of incubation. For longer incubation periods, the binding decreased progressively, lowering until 10 % after 48 h of incubation. The 2 antiserums were also tested at 4°C and 37°C (at the same initial dilution of 1/40,000). The kinetics of binding of the labelled antigen at 4°C was identical to that obtained at room temperature. At 37°C, the kinetics was more rapid: the binding was maximal after 10 h, and further incubation led to rapid degradation. From these results, we decided to use an overnight incubation (18 to 20 h) at room temperature with an antiserum initial dilution of 1/40,000, leading to easy conditions for working.

3.3. Labeling

The self labeling of MPO with ^{125}I and H_2O_2 , followed by gel filtration chromatography on Sephadex G10 yielded a tracer molecule that could be used as labelled antigen. The standardization of the chromatographic column indicated that undegraded labelled MPO was eluted with the third buffer (0.05 M phosphate, 0.5 % BSA, 0.05 % Na azide, 0.1 % poly-L-lysine) (fig 1, C). The elution with the first buffer (phosphate without poly-L-lysine) discarded the degraded or polymerized MPO (high molecular weight) (fig 1, A), and the second buffer (Na acetate) discarded the remaining iodide anions (fig 1, B). The labelled MPO eluted with the third buffer, had a good immunoreactivity (30% were bound by the antiserum at the initial dilution of 1/40,000) with low non specific binding ($\leq 5\%$) and remained stable and immunoreactive for 40 days after labeling. The main specific activity calculated for 3 different labelings was 25 ± 2 mCi/mg.

Fig. 1

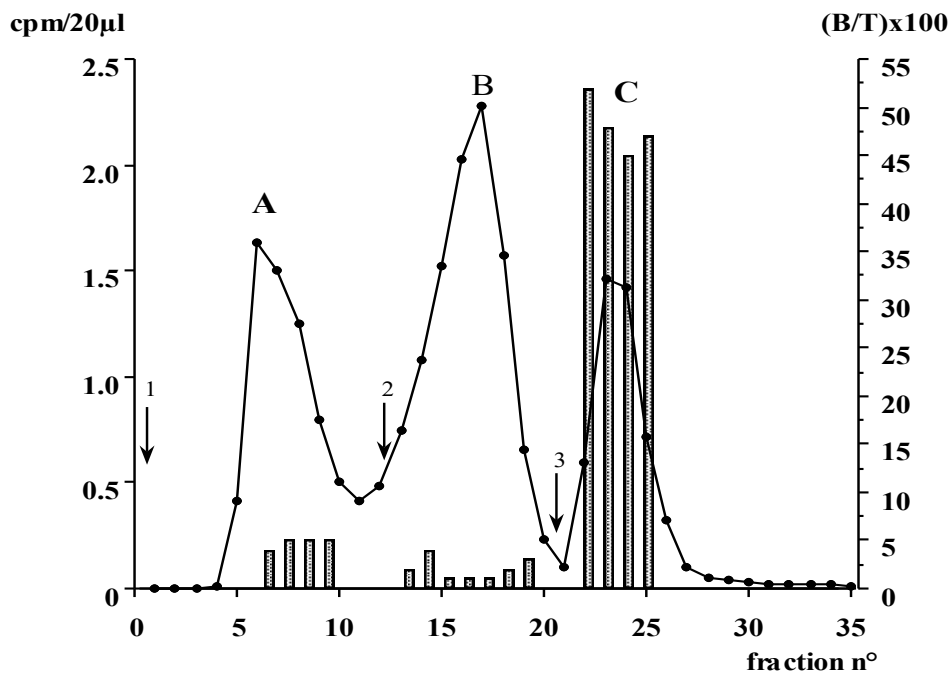
Elution profile of ^{125}I labelled MPO purified by gel filtration chromatography on Sephadex G10 column (0.9 x 15 cm).

Left ordinates : radioactivity (● — ●) in counts/min (cpm) for a 20 μl aliquot of each eluted fraction of 1 ml.

Right ordinates : immunoreactivity (\square) in % of B/T (B : binding of tracer to the diluted antiserum ; T : total activity added to the test tube).

1: first buffer: 0.05 M phosphate, 0.5 % BSA, 0.05 % Na azide, pH 7.4 ; 2 : second buffer : 0.5 M Na acetate, pH 5.5 ; 3 : third buffer : same as 1 + 0.1 % poly-L-lysine

A: degraded labelled MPO ; B : unbound ^{125}I anions ; C: undegraded labelled MPO.



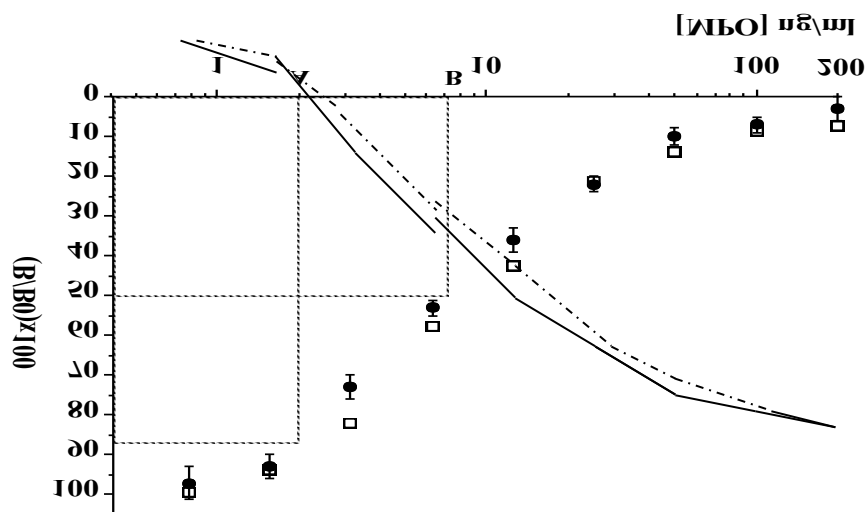
3.4. RIA procedure and validation

Figure 2 shows a typical standard RIA curve obtained with the antiserum at the initial dilution of 1/40,000, and increasing concentrations of unlabelled MPO ranging from 1 to 200 ng/ml ($n = 10$ for each concentration). The minimal concentration of MPO detected by RIA was 1.9 ng/ml (fig 2 : point A). The MPO concentration at 50% of B/B_0 (in the linear part of the curve) was 7ng/ml (fig 2 : point B). When an old labelled antigen solution (30 days after labeling) was used, no significant change was observed in the standard RIA curve (dotted curve of fig 2).

Fig. 2 Standard curves of RIA for equine MPO obtained with labelled MPO used 4 days (\bullet — \bullet) or 30 days (\square - - - \square) after labeling.

Ordinates : ratio (%) between the amount of tracer bound to the antibody in the presence (B) or the absence (B_0) of unlabelled antigen.

Abscissae : increased concentrations of unlabelled MPO in ng/ml (logarithmic scale)
 A : limit of sensibility of RIA; B : sensibility at 50 % of B/B₀.



The error profile indicated an excellent reproducibility for unlabelled MPO concentrations ranging between 2 and 62 ng/ml with a coefficient of variation (CV) lower than 5 % .

For the determination of MPO in plasma, the coefficient of variation (intra- or interassay) never exceeded 6 and 8 % respectively for MPO values ranging from 2 to 60 ng/ml (tab 1). In plasma samples added with MPO (from 10 to 50 ng/ml), the amounts that were measured indicated a mean recovery of 93 ± 4 %.

The cross-reaction of the antiserum with equine albumin and haemoglobin was less than 0.001 % . We did not find measurable values of MPO in equine platelets, eosinophils and lymphocytes. In isolated equine neutrophils and monocytes, the MPO concentration correlated with the number of cells (5 to 8×10^{-3} ng/neutrophil and $\pm 0.5 \times 10^{-3}$ ng/monocyte), confirming the specificity of the antiserum used for the RIA.

Table 1. Reproducibility (intra and interassay) of measurements of blood MPO.
 CV : coefficient of variation ; SD : standard deviation.

n	mean MPO value (ng/ml)	SD	CV (%)
intra-assay			
5	55	3.0	5.4
6	42	2.0	4.7
6	62	3.0	4.8
5	33	2.0	6.0
4	12	0.5	4.2
interassay			
6	60	4.0	6.7
5	37	2.5	6.8
5	44	2.0	4.5
5	28	2.0	7.1
5	10	0.8	8.0

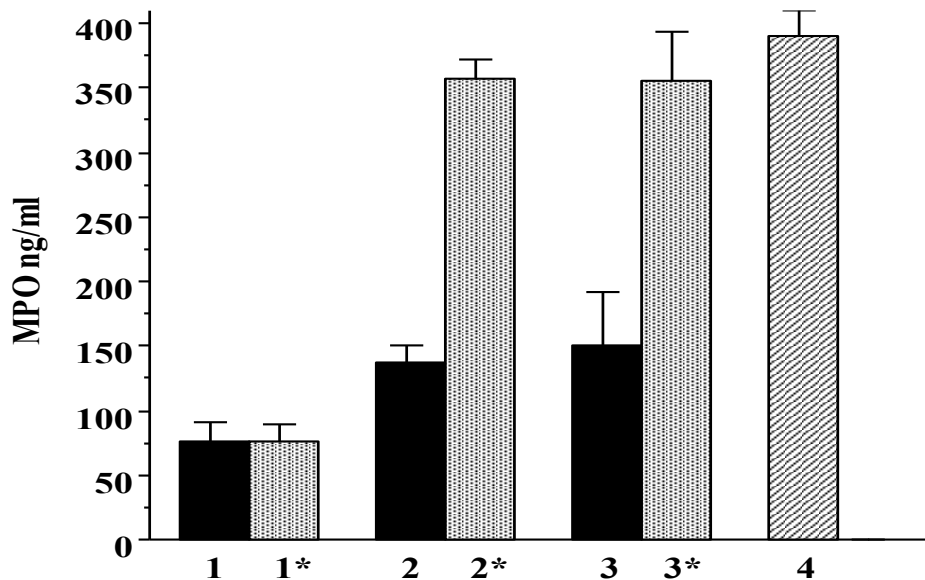
3.5. Measurement of blood MPO

3.5.1. Normal values and role of anticoagulation technique

The mean MPO concentration of blood significantly varied with the anticoagulant that was used, and with the time elapsed between sampling and centrifugation (fig 3). The mean value measured in EDTA-anticoagulated blood (n = 15) was 76 ± 15 ng/ml, and remained unchanged even when the blood was centrifuged after a delay of 210 minutes (fig 3, histograms 1 and 1*). The mean MPO values were higher in heparinized or citrated blood, and these mean values still increased when the centrifugation was delayed (fig 3, histograms 2, 2*, 3 and 3*). The highest mean value was found in serum (fig 3, histogram 4). From these results, we decided to use EDTA-anticoagulated blood for all the other studies, and found that the mean normal value in EDTA samples (n = 48) was 69.5 ± 19.4 ng/ml (range : 28 to 114 ng/ml). A blood MPO value that was above 129 ng/ml ($69.5 + 58.2$ ng/ml = mean value + 3 SD) was considered as an abnormal value (risk of error : $p < 0.01$).

Fig. 3 Mean blood values of MPO in the horse : effects of blood sampling technique (n=15).
1 : anticoagulation with EDTA, immediate centrifugation

- 1* : anticoagulation with EDTA, centrifugation after 210 minutes
- 2 : anticoagulation with heparin, immediate centrifugation
- 2* : anticoagulation with heparin, centrifugation after 210 minutes
- 3 : anticoagulation with citrate, immediate centrifugation
- 3* : anticoagulation with citrate, centrifugation after 210 minutes
- 4 : mean serum value.



3.5.2. Effects of daily variations, transport conditions, anaesthesia and surgery

The stress of transport did not influence the mean plasmatic value of MPO: 58.7 ± 29.6 ng/ml compared to the normal value of 69.5 ± 19.4 ng/ml. On the other hand, it appeared that daily variations of the MPO concentration could be observed in the same horse (tab 2).

Anaesthesia and surgical operation had little influence on the blood concentration of MPO. The individual values that were obtained for 17 horses, are presented on figure 4. MPO values were often slightly increased after surgery, but only increased above the upper limit of the normal value in 4 horses. No post surgical complications were observed in these horses.

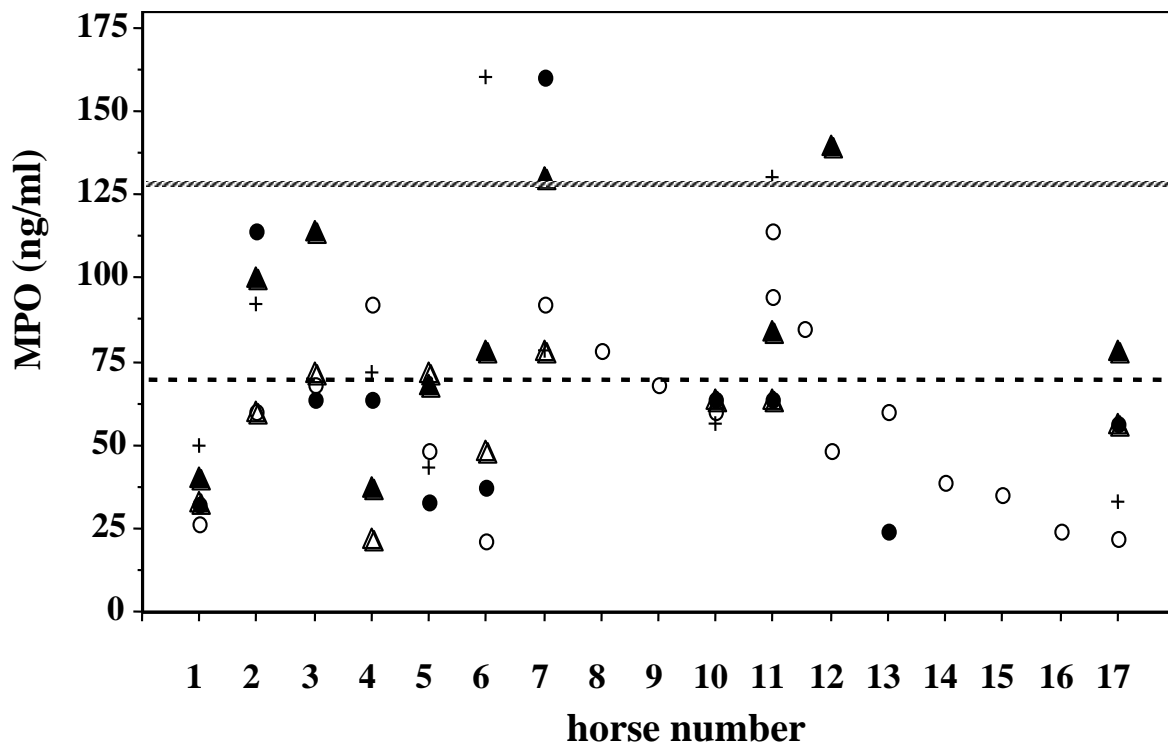
Table 2. Daily variations of the blood values of MPO (ng/ml) in 3 horses.

a : ante meridiem ; b : post meridiem

Timing of blood sampling	horse 1	horse 2	horse 3
8 am ^a	22	23	92
12 am	38	56	160
2 pm ^b	37	78	138
4 pm	50	60	79
6 pm	78	79	129
8 pm	120	30	78

Fig. 4

Effects of anaesthesia and surgery on the blood values of MPO in 17 horses (eight geldings, five stallions, and four mares; mean age: 6 years) admitted for pathologies without systemic impact. Blood was drawn before surgery (○), during surgery (●), at the end of anaesthesia (□), 1 h (△), 4 h (▲) and 24 h (+) after the end of anaesthesia. - - - mean normal value (69.5 ng/mL) and "-----" upper limit of normal value (129 ng/mL).

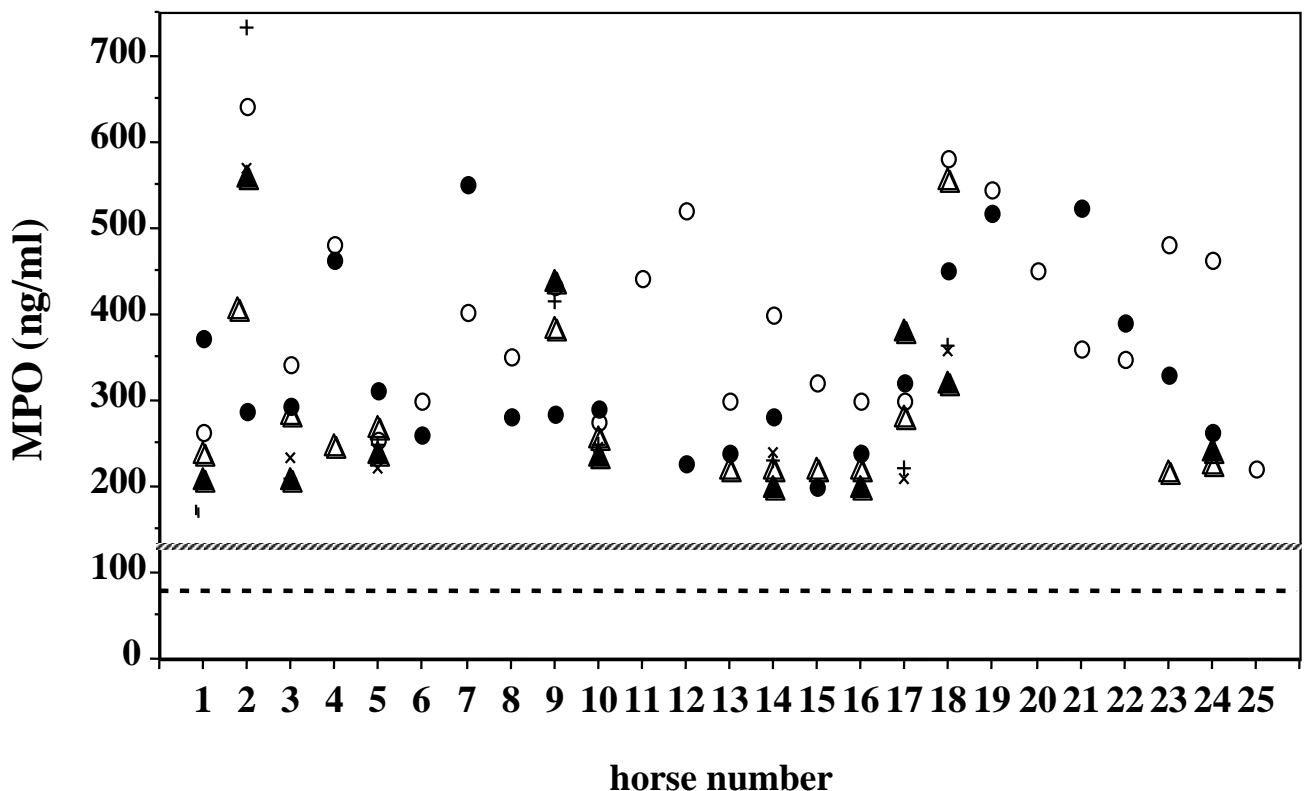


3.5.3. Blood MPO in intestinal pathologies

High values of MPO (above the upper limit of the normal value) were measured in all the blood samples drawn from the 25 horses. MPO values ranged from 200 until 732 ng/ml (fig 5). In the horses with intestinal obstruction without strangulation, 5 minor complications (temporary ileus, wound infection, controlled peritonitis) and one peritonitis (with survival) were observed. In strangulated pathologies, one laminitis and two controlled major complications were observed. Seventeen horses died from endotoxic shock.

Fig. 5

Effects of intestinal pathologies on the blood values of MPO in 25 horses (11 geldings, three stallions, and 11 mares ; mean age : 8 years). Blood was drawn at the arrival at the intensive care unit (○), during surgery (●), at the end of surgery (□), 4 h (Δ), 8 h (▲), 12 h (+) and 16 h (x) after surgery. - - - mean normal value (69.5 ng/mL) and "/////" upper limit of normal value (129 ng/mL).



4. Discussion

4.1. RIA conditions

After 2 extractions in saline medium and in the presence of detergent, and after 2 chromatographic steps, the equine neutrophil MPO was obtained in a highly purified form, with spectral and enzymatic characteristics similar to that of human and bovine MPO (Mathy-Hartert et al., 1998). By electrophoresis, we found protein bands identical to that of human MPO (Olsen and Little, 1984; Miyasaki et al., 1986), enzymatically active and glycosylated; the most intense band was that of the precursor form of the enzyme (88 kDa). The protein was free from elastase and collagenase activities and was not contaminated by albumin or other proteins with molecular weight < 60 kDa. The purification of equine neutrophil MPO had never been described before, so that it was impossible to compare with literature data.

The labeling of MPO with ^{125}I was a key step in the design of a radioimmunological technique for MPO measurement. The labelled MPO, that was obtained by application of the classical labeling methods (with chloramine T or lactoperoxidase) gave a degraded protein (chloramine T method) or a labelled MPO with a low specific activity (lactoperoxidase method). We previously obtained similar results for the labeling of human neutrophil MPO (Deby-Dupont et al., 1991) and designed a technique of self-labeling for this enzyme. This technique is based on the capacity of MPO to use H_2O_2 and halogen ions to form hypohalogenous acids, and by this way to transfer a halogen atom on proteins. The iodination of proteins on their tyrosyl residues by MPO in the presence of Na^{125}I and H_2O_2 has been largely demonstrated (Klebanoff and Clark, 1977). When this technique of self labeling was applied to pure equine MPO in the absence of other proteins and chloride anion, we could bind ^{125}I on MPO itself, and obtain a labelled antigen that could be used until 40 days after labeling without loss of immunoreactivity and with low non specific binding. The major difficulty was the purification step of ^{125}I -MPO by chromatography to separate the tracer from degraded products and unreacted iodide. Like human MPO, equine MPO easily remained absorbed on the gel filtration column. This absorption often led to slow elution and degradation. However, the use of 3 different buffers and the addition of poly-L-lysine to the last elution buffer allowed to obtain the tracer in an undegraded and active form. These problems were similar to those encountered for the purification of the molecule from equine neutrophils, and seemed linked to the high hydrophobicity of the molecule (Mathy-Hartert et al., 1998).

The absence of cross reaction with equine albumin and blood cell proteins other than neutrophils and monocytes afforded the proof that the antiserum was specific for MPO. It has been demonstrated that MPO is present in human monocytes, and that these cells lose their endogenous MPO during their maturation into macrophages (Locksley and al., 1987; Mathy-Hartert et al., 1996). The positive reaction of the antiserum used in the RIA indicated that horse monocytes also have an enzyme with a proteic structure identical to that of neutrophil MPO. On the contrary, a positive reaction was not observed with equine eosinophils, what suggested that important differences exist between the proteic structure of the eosinophil peroxidase and that of neutrophil myeloperoxidase. Similar results were obtained for human neutrophil MPO (Pincemail et al., 1991). The cross reaction of the antiserum with other proteins from neutrophil granules such as elastase, lactoferrin and cathepsins was not tested since we had not these pure equine proteins. However, the results of the electrophoresis of equine MPO after purification, and the absence of elastase and collagenase activities in the pure preparation of MPO allowed us to conclude to the absence of contamination and cross reaction of the antiserum with the other granule proteins.

The RIA conditions were easy, including an overnight incubation at room temperature and the double antibody technique of precipitation. The sensitivity (1.9 ng/ml) allowed an easy measurement of MPO in plasma without extraction or sample concentration. The error profile, the intra- and interassay coefficients of variation, and the correct recovery of added amounts of MPO in plasma indicated good accuracy, reproducibility and precision.

4.2. Applications to plasma

The mean MPO concentration significantly varied with the anticoagulant added to the whole blood, and with the delay between blood sampling and centrifugation. The values in serum were elevated because the blood coagulation led to the stimulation of the neutrophils, with degranulation and partial destruction (confirmed by light microscopy observations). In citrated or heparinized plasma samples, which were obtained by immediate centrifugation of the blood (within 10 minutes), the mean MPO concentration was around 150 ng/ml. But these values quickly increased when the centrifugation was delayed over more than 10 minutes, and the increase was more important for citrated plasma samples. The best conditions for blood sampling were to use EDTA for anticoagulation. The normal mean MPO value that was obtained in these conditions remained stable, even if the blood centrifugation was delayed for

3 hours. These results were comparable to the results that we previously obtained for the measurement of neutrophil MPO in human blood (Pincemail et al., 1991). For further studies, we thus always used EDTA for anticoagulation. When the use of EDTA was impossible (in some surgical conditions), we used heparin and rapid centrifugation of the blood sample (within a maximal delay of 10 minutes) to avoid the *in vitro* degranulation of neutrophils leading to artefact values of MPO.

The daily variations of MPO were sometimes important, and explained that the upper limit of the normal value was taken as the mean normal value + 3 standard deviations of the mean (69.5 + 58.2 ng/ml). In these conditions, the risk of error on the determination of the pathological values was lower than 0.01 %. Moreover, these daily variations must be taken into account in future studies, and will justify repeated blood samplings for the same horse.

The stress of anaesthesia and surgery for pathologies without systemic repercussion had little effects on the blood value of MPO. An increase of MPO, above the upper limit of the normal value, was observed in four horses only, during or after surgery, suggesting a mild inflammatory reaction with neutrophil activation. In man, we previously described a similar increase of blood MPO occurring in the first 24 hours after trauma and surgery (Faymonville et al., 1991; Deby-Dupont et al., 1997). These preliminary results in horses would justify an extended study with a longer follow up of the animals.

In the horses with obstructive intestinal pathologies, the blood MPO concentrations were always high, largely above the upper limit of the normal value. The MPO values were already high at the arrival of the animal to the intensive care unit, and remained high until 16 hours after the end of surgery. In animals which survived, the MPO values were still high after 24 hours. These increased MPO values could not be related to daily variations, but to an *in vivo* activation and degranulation of the neutrophils in the systemic blood flow. This activation could be the consequence of a local translocation of endotoxins or local ischemia-reperfusion phenomena, and could be, at least partially, responsible for the inflammatory reactions and contribute to the onset of endotoxic shocks that often occurred in these intestinal pathologies (Moore et al., 1994; Yarbrough et al., 1994). These preliminary results were encouraging and confirmed that the measurement of plasma MPO could be taken as the witness of neutrophil activation. But the data need to be amplified by studying a large number of animals, and to be submitted to fine analysis in relation with the gravity and the evolution of the intestinal pathology.

Acknowledgements

This work was supported by Funds for Scientific and Medical Research (FRSM) - Belgium Grants n° 3.4556.95 and 3.4615.98.

References

- Deby-Dupont, G., Croisier, J.L., Camus, G., Brumioul, D., Mathy-Hartert, M., Sondag, D., Deby, C., Lamy, M., 1994. Inactivation of α_2 -macroglobulin by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Med. Inflamm.* 3, 117-123.
- Deby-Dupont, G., Faymonville, M.E., Adam, A., Damas, P., Lamy, M., 1997. Markers of early neutrophil activation in trauma patients. *Med. Inflamm.* 6, 155 (abstract).
- Deby-Dupont, G., Pincemail, J., Thirion, A., Deby, C., Lamy, M., Franchimont, P., 1991. Self-labeling of human polymorphonuclear leucocyte myeloperoxidase with 125 iodine. *Experientia* 47, 952-957.
- Eklund, A., Eriksson, Ö., Häkansson, L., Larsson, K., Ohlsson, K., Venge, P., Bergstrand, H., Björnson, A., Brattsand, R., Glennow, C., Linden, M., Wieslander, E., 1988. Oral N-acetylcysteine reduces selected humoral markers of inflammatory cell activity in BAL fluid from healthy smokers : correlation to effects on cellular variables. *Eur. Respir. J.* 1, 832-838.
- Faymonville, M.E., Pincemail, J., Duchateau, J., Paulus, J.M., Adam, A., Deby-Dupont, G., Deby, C., Albert, A., Larbuisson, R., Limet, R., Lamy, M., 1991. Myeloperoxidase and elastase as markers of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 102, 309-317.
- Fujishima, S., Aikawa, N., 1995. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med.* 21, 277-285.
- Green, E.M., Adams, R., 1992. New perspectives in circulatory shock: pathophysiologic mediators of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 200, 1834-1841.
- Hazen, S.L., Hsu, F.F., Mueller, D.M., Crowley, J.R., Heinecke, J.W., 1996. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J. Clin. Invest.* 98, 1283-1289.

Hurst, J.K., 1993. Oxygen-derived toxins generated by neutrophils and their microbicidal mechanisms. In: D.H.R. Barton, A.E. Martell and D.T. Sawyer (editors), *The activation of dioxygen and homogenous catalytic oxidation*, Plenum Press, New York, pp. 267-286.

King, C.C., Jefferson, M.M., Thomas, E.L., 1997. Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 61, 293-302.

Klebanoff, S.J., 1992. Oxygen metabolites from phagocytes. In: J.I. Gallin, I.M. Goldstein and M.D. Snyderman (editors), *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, Raven Press, New York, pp. 391-444.

Klebanoff, S.J., Clark, R.A., 1977. Iodination by human polymorphonuclear leukocytes: a re-evaluation. *J. Lab. Clin. Med.* 89, 675-686.

Locksley, R.M., Nelson, C.S., Fankhauser, J.E., Klebanoff, S.J., 1987. Loss of granule myeloperoxidase during in vitro culture of human monocytes correlates with delay in antiprotozoa activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 541-58.

Mathy-Hartert, M., Deby-Dupont, G., Melin, P., Lamy, M., Deby, C., 1996. Bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* is acquired by cultured human monocyte-derived macrophages after uptake of myeloperoxidase. *Experientia*, 52, 167-174.

Mathy-Hartert, M., Bourgeois, E., Grulke, S., Deby-Dupont, G., Caudron, I., Deby, C., Lamy, M., Serteyn, D., 1998. Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leukocytes. *Can. J. Vet. Res.* 62, 127-132.

Miyasaki, K.T., Wilson, W.E., Cohen, E., Jones, P.C., Genco, R., 1986 Evidence for and partial characterization of three major and three minor chromatographic forms of human neutrophil myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 751-764.

Moore, R.M., Bertone, A.L., Bailey, M.Q., Muir, W.W., Beard, W.L., 1994. Neutrophil accumulations in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1454-1463.

Moore, J.N., Morris, D.D., 1992. Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 200, 1903-1914.

Morris, J.N., 1991. Endotoxemia in horses: a review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J. Vet. Int. Med.* 5, 167-181.

Nishizawa, H., Yamada, H., Miyazaki, H., Ohara, M., Kaneko, K., Yamakawa, T., Wiener-Kronish, J., Kudoh, I., 1996. Soluble complement receptor type 1 inhibited the systemic organ injury caused by acid instillation into a lung. *Anesthesiology* 85, 1120-1128.

- Odell, E.W., Segal, A.W., 1988. The bactericidal effects of the respiratory burst and the myeloperoxidase system isolated in neutrophil cytoplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 971, 266-274.
- Olsen, R.L., Little, C., 1984. Studies on the subunits of human myeloperoxidase. *Biochem. J.* 222, 701-709.
- Pincemail, J., Deby-Dupont, G., Deby, C., Thirion, A., Torpier, G., Faymonville, M.E., Damas, P., Tomassini, M., Lamy, M., Franchimont, P., 1991. Fast double antibody radioimmunoassay of human granulocyte myeloperoxidase and its application to plasma. *J. Immunol. Methods* 137, 181-191.
- Pycock, J.F., Allen, W.E., Morris, T.H., 1987. Rapide, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous Percoll density gradient. *Res. Vet. Science* 42, 411-412.
- Test, S.T., Weiss, S.J., 1986. The generation and utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils. *Adv. Free Radical Biol. Med.* 2, 91-116.
- Weiland, J.E., Davis, W.B., Holter, J.F., Mohammed, J.R., Dorinsky, P.M., Gadek, J.E., 1986. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 218-225.
- Weiss, S.J., 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320, 365-376.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., 1990. CD-14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Sciences* 249: 1431-1433.
- Yarbrough, J.B., Snyder, J.R., Harmon, F.A., O'Connell, K.A., 1994. Evaluation of myeloperoxidase concentrations in experimentally induced equine colonic ischaemia and reperfusion. *Equine Vet. J.* 26, 67-69.

**PLASMA MYELOPEROXIDASE LEVEL AND
POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTE ACTIVATION IN
HORSES SUFFERING FROM LARGE INTESTINAL
OBSTRUCTION REQUIRING SURGERY**

S. Grulke, H. Benbarek, I. Caudron, G. Deby-Dupont, M. Mathy-Hartert, F. Farnir,
C. Deby, M. Lamy, D. Serteyn

Anesthésiologie générale, Pathologie chirurgicale des grands animaux. Faculté de Médecine Vétérinaire. Université de Liège. B41 4000 Sart Tilman, Belgium (Grulke S., Benbarek H., Caudron I., Serteyn D.)

Centre de Biochimie de l'Oxygène. Université de Liège. B6 4000 Sart Tilman, Belgium (Deby-Dupont G., Mathy-Hartert M., Deby C., Lamy M.)

Génétique quantitative. Faculté de Médecine Vétérinaire. Université de Liège. B41 4000 Sart Tilman, Belgium (Farnir F.)

Abstract

Myeloperoxidase (MPO) is a specific enzyme of neutrophil azurophilic granules with a strong oxidative activity. Thanks to a radio-immuno assay of equine myeloperoxidase, the authors have observed a significantly higher plasma level of MPO in horses operated for strangulation obstruction of the large intestine (n=6) than in horses suffering from a non-strangulating displacement of the large intestine (n=9). For the two groups, three phases were distinguished: reception (P1), intensive care (P2) and terminal phase (P3). The mean peak values of MPO for these phases were respectively 121.6 ng/mL (P1) ; 168.6 ng/mL (P2) and 107.0 ng/mL (P3) for the non-strangulating group and 242.6 ng/mL (P1) ; 426.0 ng/mL (P2) and 379.5 ng/mL (P3) for the strangulation group. The variations of the mean peak values of plasma MPO were significantly different between the two groups and between the different phases. A significant increase of the least square means of MPO was observed between P1 and P2. A significant decrease of the least square means of the number of circulating leucocytes was observed between P1 and P3. Polymorphonuclear neutrophil activation could play a major role in the pathogenesis of acute abdominal disease and endotoxic shock.

Résumé

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme localisée essentiellement dans les granules azurophiles des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et contribue au stress oxydatif observé lors de l'activation des PMN. A l'aide d'un dosage radio-immunologique, les auteurs ont observé un taux plasmatique significativement supérieur chez les chevaux opérés d'une obstruction étranglée du gros intestin (n=6) que chez ceux atteints d'un déplacement simple du gros intestin (n=9; groupe de contrôle). Pour les deux groupes trois phases ont été différenciées (réception, soins intensifs et phase terminale). Les moyennes des valeurs pics de MPO étaient respectivement de 121,6 ng/mL (P1); 168,6 ng/mL (P2) et 107,0 ng/mL (P3) pour le groupe de contrôle et de 242,6 ng/mL (P1); 426,0 ng/mL (P2) et 379,5 ng/mL (P3) pour le groupe présentant une obstruction étranglée. Les variations des valeurs moyennes de MPO étaient statistiquement différentes entre les deux groupes et entre les différentes phases. Une augmentation de la MPO (least square means) entre les phases P1 et P2 ainsi qu'une diminution du taux moyen de globules blancs circulants (least square means) entre les phases P1 et P3 étaient observées. L'activation des polymorphonucléaires neutrophiles pourrait jouer un rôle

majeur dans la pathogénie des pathologies intestinales aiguës et le choc endotoxinique chez le cheval.

Introduction

Strangulation obstruction of the small intestine and large colon are common causes of acute abdominal disease in the horse. Mortality associated with intestinal strangulation in horses is quite variable but usually ranges between 50% and 80 % (1, 2, 3, 4, 5, 6). Despite surgical correction, intensive medical therapy and supportive care, the prognosis of horses with strangulating intestinal lesions is guarded.

During a small intestinal strangulation obstruction, a complete necrosis of the mucosal epithelium extending to the base of the crypts occurs by 3 to 4 hours, and by 6 to 7 hours the degeneration has progressed outwards beyond the muscular layers (7, 8). It also appears that 3 to 4 hours of complete ischemia of the large colon caused by arteriovenous occlusion results in irreversible damage of the mucosa (9). The progression of mucosal epithelial injury may lead to complete mucosal necrosis, with disruption of the mucosal barrier; this favours migration of luminal bacteria and endotoxin into the systemic circulation, resulting in endotoxemia (5, 10, 11).

Furthermore, the intestinal injury that occurs during strangulation may progress after detorsion due to irreversible cellular alterations that occurred during the ischemic period, or due to exacerbation of cellular injury as a result of the cascade of events initiated on reperfusion (12, 13). Reactive oxygen metabolites produced by the system xanthine/xanthine oxydase or by the alteration of the mitochondrial chain seem to play a major role in the cellular lesions. Moreover, as observed in rabbit colons, polymorphonuclear neutrophils (PMN) accumulate in the colonic mucosa of horses during low-flow arterial ischemia and especially on reperfusion (14, 15). Activated neutrophils produce reactive oxygen species, lipid mediators such as leukotrienes, platelet-activating factors and prostanoids and release several enzymes such as proteases and myeloperoxidase from their granules (16). A high activity of myeloperoxidase (MPO) was found in the intestinal mucosa after experimental low-flow ischemia and reperfusion (15). MPO is an enzyme located exclusively in the neutrophil azurophilic granules of neutrophils. Eosinophils contain the eosinophil peroxidase (EPO), a peroxidase which shares

similar functions with MPO. However human MPO and EPO are immunologically different. Indeed, antisera obtained against MPO do not cross react with EPO (17). MPO produces hypochlorous acid from chloride anions and hydrogen peroxide, the latter being produced by superoxide anion dismutation (18).

MPO can be measured by enzymatic assays or immunological techniques. Enzymatic assay measures easily the peroxidasic activity in tissues (19). Peroxidasic activity is not specific for MPO, but is the witness of the activity of different peroxidases (MPO and EPO). Moreover plasma albumin is an inhibitor of MPO activity. In order to perform enzymatic measurement of MPO in plasma, a gel filtration or an ion exchange chromatography of the plasma sample is necessary to isolate the MPO from the other plasma proteins such as albumin, considered to be an inhibitor of MPO activity. Furthermore, it appears that MPO is inactivated when released by degranulation in the extracellular milieu (20).

In human medicine, the immunological technique for MPO assays has been applied to plasma. A high level of plasma MPO is considered to be a proof of neutrophil activation and degranulation, but not correlated to the number of neutrophils in plasma (21). Activated neutrophils trapped in specific organs release their granulocyte content in the extracellular milieu. The granulocyte enzyme can therefore increase in plasma. One of the main objectives of this study was to follow the variation of MPO plasma levels to demonstrate that equine strangulation obstruction was not only characterised by local influx of neutrophils but also by the extension of inflammation and the dispersion of the granulocytic enzymes to the general circulation.

Equine myeloperoxidase was previously purified from equine neutrophils by detergent extraction followed by two chromatographic steps (ion-exchange and gel filtration chromatography). This pure equine MPO consists of a mixture of the precursor and mature forms of the enzyme, with a respective molecular mass of 88 and 140 KDa, similar to the human MPO. The spectral characteristics, the enzymatic properties and the pH dependency were also identical to those of human MPO (22). A specific antiserum was obtained by immunising rabbits with pure equine MPO. A specific radioimmunoassay (RIA) was designed using this antiserum to measure MPO in horse plasma obtained from ethylene-diamine-tetraacetic-acid (EDTA)-anticoagulated blood (23). In a previous study we determined the physiological mean

value of plasmatic MPO level as 69.5 ± 19.4 ng/mL for normal horses (50 warmblood horses, healthy, mares and geldings with an age ranging between 4 and 20 years). A physiological range can be considered as mean \pm 3 standard deviations (Sd), that is to say a maximal value of 128 ng/mL. This choice assures a probability of error in determination of abnormally high values lower than 0.01%. In the same study MPO was determined for horses immediately after the transport, before, during and after general anaesthesia for minor surgeries not affecting the general condition and variation during 24-hours showing that there was no significant increase of MPO in these conditions (23).

In a clinical study, the variations of the MPO plasmatic level of six horses with large intestine strangulation obstruction were compared with the values obtained in nine other horses operated for a non-strangulating displacement of the large colon. These variations were compared to the variations of the number of circulating leucocytes.

Material and methods

Fifteen horses in two groups, referred for an acute abdominal disease were used in this study. The first group considered as control consisted of 9 horses suffering from a non-strangulating obstruction of the large intestine (left dorsal displacement or right displacement of the left colon). This group consisted of 8 mares and 1 gelding (one thoroughbred and 8 warmblood horses), ranging between 4 and 18 years. The follow up was successful with no major complications. The second group consisted of 6 horses suffering from a large intestine strangulation obstruction leading to severe complications and death (complete volvulus of ascending colon, torsion of caecum or left colon). This group consisted of 2 mares, 3 geldings (warmblood horses) and 1 stallion (thoroughbred) with an age ranging between 3 and 25 years.

A clinical evaluation was performed on admission (of the horse in our clinic). The horses considered in this study did not present signs of severe shock at reception (heart and breathing rates higher than normal, commensurate pain, normal pulse quality, normal systolic pressure, no increase in packed cell volume or lactate). A gravity index (GI) was established and was based on the intensity of five parametres classified in three categories estimating intestinal obstruction: abdominal distension (no distension, distension located in one flank, severe distension of both flanks), organ distension on rectal examination (only located

distension of one organ, more severe distension but exploration possible, no exploration possible), amount of gastric reflux (no reflux, less than 4 litres, more than 4 litres), intestinal borborygmies (located modification, more extended modification, generalised absence of borborygmies) and pain (response to slight analgetics, response to strong analgetics, no response to analgetics). A rank sum test-Wilcoxon was performed on the gravity index of the two groups.

Before premedication, blood samples were drawn for biochemical analysis (packed cell volume, leucocytes, lactate, blood gases, ions) and for MPO plasma assay (phase 1). Premedication consisted of xylazine administration (0.6 mg/kg). Anesthesia was induced with guaifenesin (10%) and thiamilal (2g/500 mL of guaifenesin), and isoflurane was used to maintain general anesthesia. After a surgical reduction of the obstruction, the horses were transferred to recovery boxes and placed in intensive care until recuperation of normal intestinal function. During this period (surgery and recuperation) corresponding to phase 2, blood samples were drawn every two hours for biochemical evaluation and MPO RIA. For group 1 (non-strangulating obstruction), a third phase 3 to 5 days after surgery was also considered. Blood samples for MPO RIA were drawn twice a day during this period. For the second group (strangulation obstruction), the 3rd phase was the time when irreversible complications appeared leading to euthanasia.

Total leucocyte count (WBC) was determined with a coulter counter (Coulter Electronics Ltd.) on each blood sample (EDTA-anticoagulated blood) used for MPO assay.

Plasma MPO was measured by a radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against equine MPO, at a dilution of 1/40,000 (antibody). The tracer molecule (=labelled antigen) was pure equine MPO labelled with 125 Iodine (Amersham, place). Incubation medium was made with 100 μ L of the diluted antiserum, 100 μ L of the tracer (\pm 30,000 cpm), and 100 μ L of the plasma sample. A standard curve was established with increasing concentrations of equine MPO solution (from 2 to 200 ng/mL) (= unlabelled antigen). Samples were incubated at room temperature for 24 hours. The reaction was stopped by precipitation of the antibody-antigen complex with a second antigen directed against rabbit gammaglobulines. After centrifugation, the supernatant was discarded and the precipitate was counted. All the reagents were prepared in phosphate buffer (0.05M, pH 7.4) and adjusted with 0.9% NaCl,

0.5% bovine serum albumin and 0.05% Na azide. The results were expressed in ng/mL of plasma.

In order to be able to compare the plasma MPO values between the two groups, the peak values obtained during each phase were taken into account: phase 1 (P1): reception; phase 2 (P2): surgery and intensive care period; phase 3 (P3): terminal phase was recuperation phase for group 1 and complication phase for group 2.

The statistical analysis of the data was studied by a general linear model procedure (analysis of variance) to test the group effect, the phase effect and the interaction between the two factors (24). The least square means were used to compare these differences and a significance was considered when $P < 0.05$.

Results

The results of the rank sum test-Wilcoxon between the two groups and calculated on the gravity index assessed at the admission gave a probability value inferior to 10%. The classification of the horses in two groups was especially based on the lesions observed during surgery and the recovery period.

Figure 1 shows all the variations of MPO values observed for each horse. The plasma MPO values measured in the non strangulating group are illustrated on figure 1a and the MPO values for the strangulation group on figure 1b. Maximal physiologic values of MPO were also reported (23). These graphs show a high level of plasma MPO in the strangulation group compared with the physiological value and compared with horses suffering from a non strangulating obstruction.

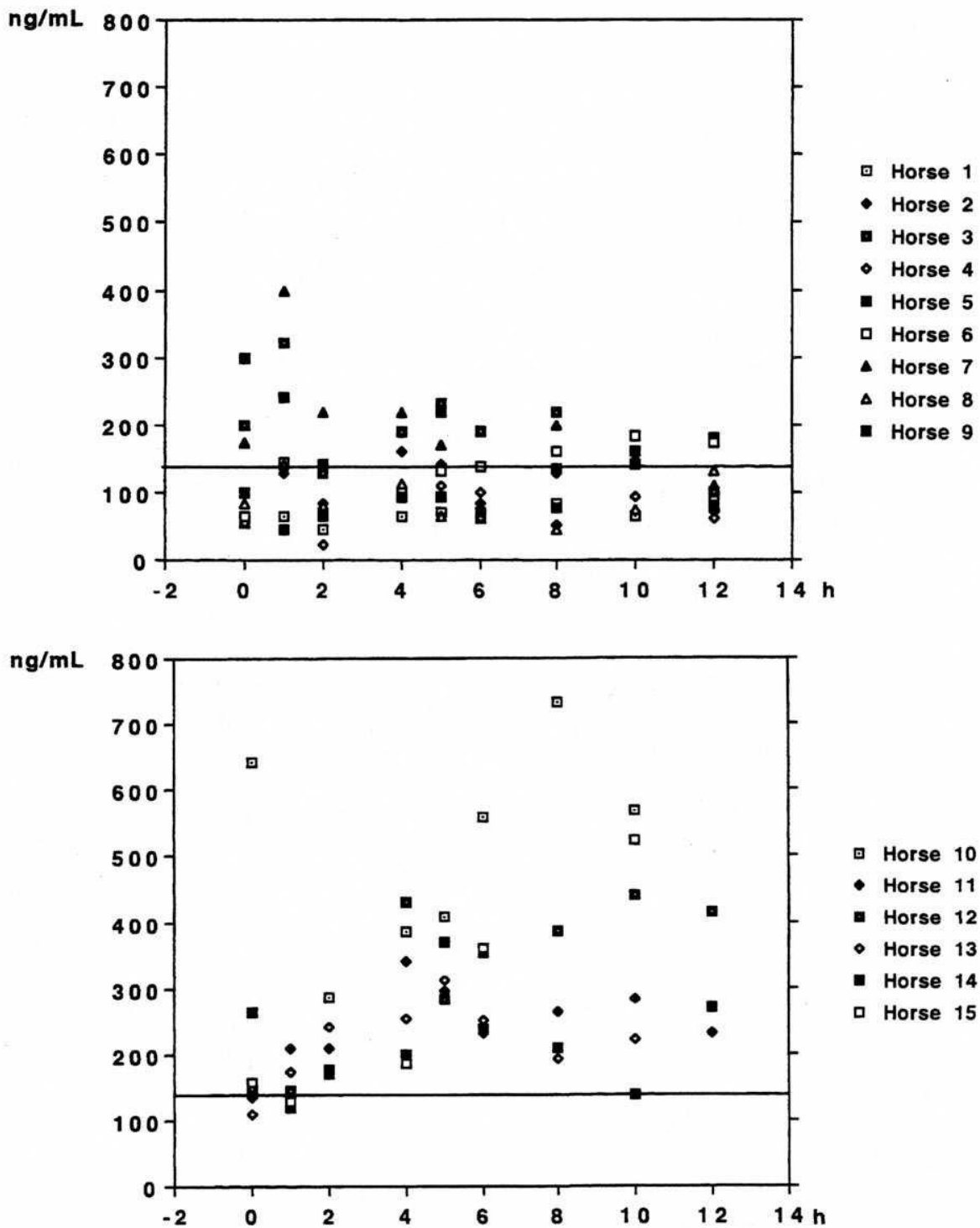


Fig. 1

Plasma myeloperoxidase (MPO) values observed for each horse. Maximal physiological values (128 ng/mL) are mentioned.

- a/ Plasma MPO values in horses (n=9) with non-strangulating displacement of large intestine
- b/ Plasma MPO values in horses (n=6) with strangulation obstruction of large intestine

Table I reports for each horse the gravity index, the time needed for recuperation of a normal intestinal function (recovery), the peak values of MPO at each phase (P1, P2, P3), the mean values of MPO of each group in each phase and the standard deviation (Sd). The variations of the mean values of plasma MPO were significantly different between the two groups and between the different phases ($P < 0.05$). The interaction between the different groups and the different phases was not significant. A significant increase of the least square means of MPO was observed between P1 (181.8 +/- 31.4 ng/mL) and P2 (297.3 +/- 31.4 ng/mL). A significant decrease of the least square means of the number of circulating leucocytes was observed between P1 (10.6 +/- 1.1 10^6 WBC/mL) and P3 (6.6 +/- 1.1 10^6 WBC/mL).

Table I

Gravity index recovery time and peak values of myeloperoxidase (MPO) of each horse during each phase on the strangulation and the non-strangulation groups

Horse N°	Gravity index	Recovery (hours)	MPO P1 peak value (ng/mL)	MPO P2 peak value (ng/mL)	MPO P3 peak value (ng/mL)
<u>Control group</u>					
N°1	2	20	56	92	64
N°2	1	32	64	160	56
N°3	1	24	200	230	80
N°4	1	15	56	130	64
N°5	2	36	300	220	190
N°6	2	18	65	184	280
N°7	2	18	172	220	76
N°8	1	63	82	142	100
N°9	2	23	100	140	53
Mean values		27.6	121.6	168.6	107.0
Standard deviation			84.9	47.7	77.2
<u>Str. Obs. group</u>					
N°10	3	-	642	732	570
N°11	3	-	136	342	231
N°12	3	-	147	440	413
N°13	3	-	108	312	269
N°14	3	-	264	371	270
N°15	2	-	159	359	524
Mean values		-	242.6	426.0	379.5
Standard deviation			202.7	155.8	144.6

Figure 2a shows on a bar graph the variations of the mean peak values of MPO for both groups at each phase. Figure 2b shows the variations of the mean values of the total leucocyte count for both groups at each phase.

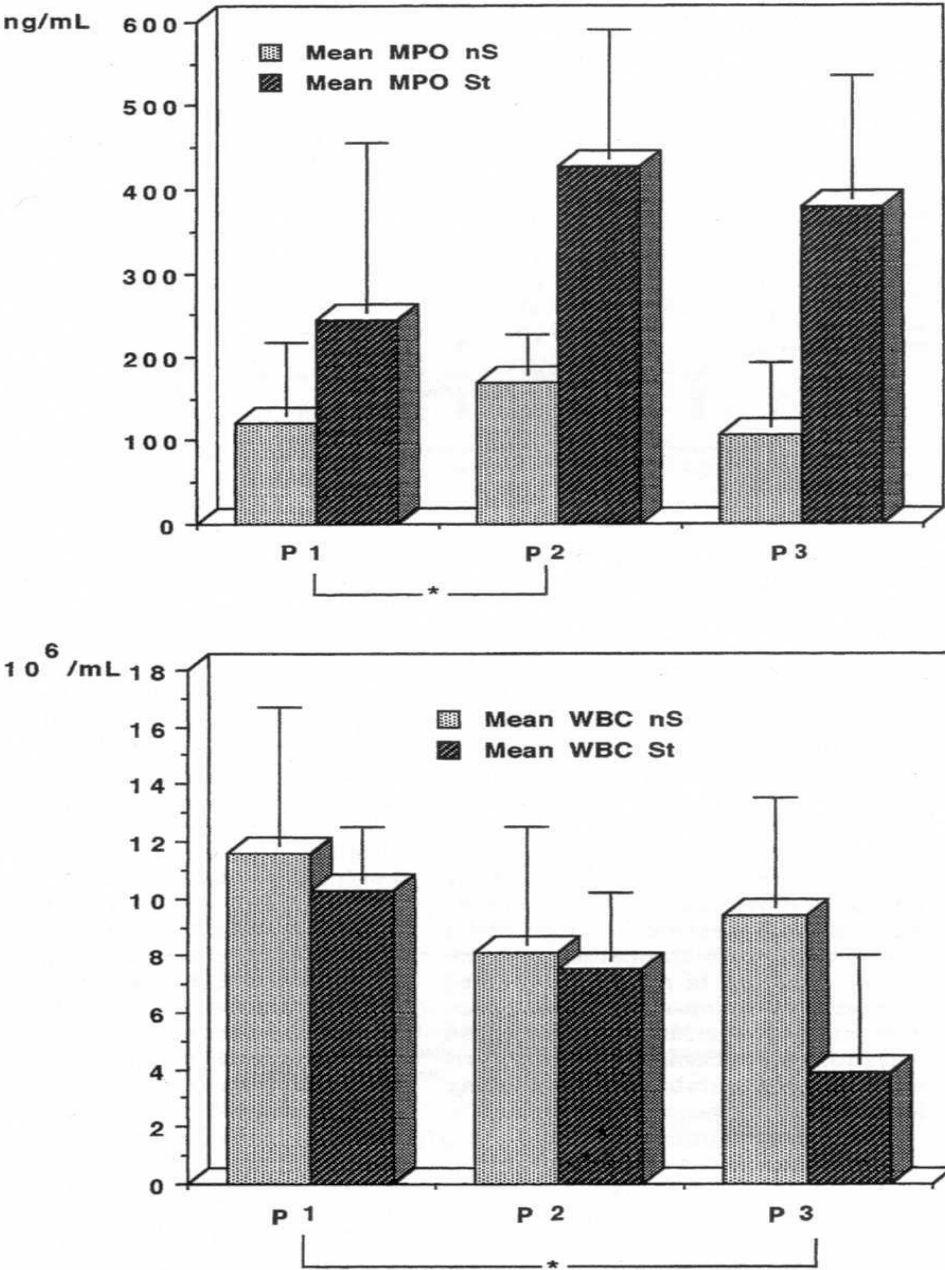


Fig. 2

a/ Variations of the mean peak values of plasma myeloperoxidase obtained at each phase in the strangulation group (St) and the non-strangulation group (nS).

*: significant difference of the least square means between phase 1 and phase 2 (P<0.05)

b/ Variations of the mean values of total leucocyte count at each phase in both groups

* : significant difference of the least square means between phase 1 and phase 3 (P<0.05)

Discussion

High values of plasma MPO measured in horses with a strangulation obstruction of the large intestine undoubtedly indicates that an activation of polymorphonuclear neutrophil has occurred. Indeed, MPO is a specific granulocyte enzyme that can be released in the extracellular space during PMN degranulation (20, 25). During acute abdominal disease, PMN activation could be induced by several substances such as lipopolysaccharides (LPS), cytokines, lipids, and histamine. Endotoxin LPS arising from a damaged intestine could activate PMN as demonstrated recently by Benbarek et al. (26) or stimulate monocytes to release different cytokines (27). Trim et al. observed that 50 % of horses were endotoxemic during surgery (28). During colic and endotoxemic shock, several authors have demonstrated a high TNF and IL-1 activity in plasma (13, 29). A tumor necrosis factor (TNF) or interleukin-1 (IL-1) are potent activators of mast cells and PMN (30). The significant difference of the plasma MPO level between the strangulation obstruction and the non-strangulating obstruction could be explained partially by the release of LPS by the ischemic bowel. Nevertheless, interaction between endotoxemia and MPO plasmatic values must be studied in the future to confirm this hypothesis.

The high MPO level in plasma was associated with a decrease of the total leucocyte count indicating that a PMN activation can occur in specific organs where neutrophils are trapped. The products of degranulation such as MPO can be released in the general circulation.

The activation of PMN produces a generation of reactive oxygen species such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical, hydrogen peroxide and nitric oxide (NO^{\cdot}), a release of lipid mediators such as prostanoids, platelet activating factor and leukotrienes and a liberation of enzymes such as proteases and MPO (16, 31). MPO produces hypochlorous acid and chloramines that can induce a high cellular toxicity (32, 33). The results of a high plasma level of MPO and the free radical generation could thus contribute to the development of an oxidative stress during equine colic. Moreover, NO^{\cdot} has been demonstrated to react with $O_2^{\cdot-}$ to give peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$). This substance is considered as one of the strongest oxidant substances generated in the biological system (34, 35).

In this study, we have also observed a large variation between the horses in each group especially for the reception phase. Indeed, two horses of the control group had MPO values superior to the physiological values indicating that other mechanisms could be implicated in the PMN activation. Furthermore, the time elapsed between the beginning of colics and the administration of the first treatment varies largely between the horses.

A variability of MPO values was observed especially in horses suffering from strangulating obstruction. This variability was also observed in human sepsis and could be explained by the intensity of local or systemic PMN activation, and the time elapsed between the blood sampling and the peak value of PMN degranulation. Indeed, in humans it has been observed that within 6 to 12 hours the MPO had disappeared from plasma. Therefore we have chosen the peak values for each phase.

As observed in table I and figure 2a, the plasmatic values of MPO during the third phase remain at a very high level in horses suffering from severe complications leading to death. In the other group MPO values returned to a normal level. Further experiments should be done to confirm a possible prognostic value of the MPO plasma level.

Acknowledgments

The authors wish to thank the "Fond National de Recherche Scientifique" (FNRS) of Belgium (grants n°3.4556.95; n° 3.4615.98).

References

- 1 **BARCLAY WP, FOERNER JJ, PHILLIPS TN.** Volvulus of the large colon in the horse. J Am Vet Med Assoc 1980; 177: 629-630.
- 2 **PASCOE PJ, MCDONELL WN, TRIM CM, VAN GORDER J.** Mortality rates and associated factors in equine colic operations - A retrospective study of 341 operations. Can Vet J 1983; 24: 76-85.
- 3 **HARRISON IW.** Equine large intestinal volvulus: A review of 124 cases. Vet Surg 1988; 17: 77-81.

- 4 **MACDONALD MH, PASCOE JR, STOVER SM, MEAGHER DM.** Survival after small intestine resection and anastomosis in horses. *Vet Surg* 1989; 18: 415-423.
- 5 **SNYDER JR, PASCOE JR, OLANDER HJ, SPIER SJ, MEAGHER DM, BLEIFER DR.** Strangulating volvulus of the ascending colon in horses. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 757-764.
- 6 **SERTEYN D, CAUDRON I, SZOKE M, FONTAINE G, STACQUEZ S, CHEVÉ D.** Diagnosis and prognosis of the surgical intestinal pathologies in horses. *Prat Vét Equine* 1994; 26: 135-145.
- 7 **WHITE NA, MOORE JN, TRIM CM.** Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. *Am J Vet Res* 1980; 41: 193-198.
- 8 **BARKER IK, VAN DREUMEL AA.** The alimentary system. In: *Pathology of Domestic Animals*. Ed: Jubb, W., Kennedy, P.C., Palmer, N. Academic Press, New York, 1985; 60-66.
- 9 **SNYDER JR, OLANDER HJ, PASCOE JR, HOLLAND M, KURPERSHOEK CJ.** Morphologic alterations observed during experimental ischemia of the equine large colon. *Am J Vet Res* 1988; 49: 801-809.
- 10 **ALLEN DA, TYLER D.** Pathophysiology of acute abdominal disease. In: *The Equine Acute Abdomen*. Ed: White, N.A. Lea & Febiger, Philadelphia, 1990; 66-87.
- 11 **SNYDER JR, PASCOE JR, OLANDER HJ, HARMON FA, HINDS DM, VATISTASA NJ, TYLER WS.** Ultrastructural mucosal injury after experimental ischemia of the ascending colon in horses. *Am J Vet Res* 1992; 53: 1917-1924.
- 12 **HORNE MH, PASCOE PJ, DUCHARME NG, BARKER IK, GROVUM WL.** Attempts to modify reperfusion injury of equine jejunal mucosa using dimethylsulfoxide, allopurinol, and intraluminal oxygenation. *Vet Surg* 1994; 23: 241-249.
- 13 **MOORE RM, MUIR WW, GRANGER DN.** Mechanisms of gastrointestinal ischemia - reperfusion injury and potential therapeutic interventions: A review and its implications in the horse. *J Vet Intern Med* 1995; 9: 115-132.
- 14 **SHANDALL AA, WILLIAMS GT, HALLET MB.** Colonic healing: a role for polymorphonuclear leukocytes and oxygen radical production. *Br J Surg* 1986; 73: 225-228.
- 15 **MOORE RM, BERTONE AL, BAILEY MQ, MUIR WW., BEARD WL.** Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Vet Res* 1994; 55: 1454-1463.
- 16 **HENSON PM, HENSON JE, FITTSCHEN C, KIMANI G, BRATTON DL, RICHES DWH.** Phagocytic cells: degranulation and secretion. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Eds: J.I. Gallin, I.M. Goldstein and M.D. Snyderman, Raven Press Ltd., New York, 1988; 363-390.
- 17 **PINCEMAIL J, DEBY-DUPONT G, DEBY C, THITION A, TORPIER G, FAYMONVILLE ME, DAMAS P, TOMASSINI M, LAMY M, FRANCHIMONT P.** Fast double radioimmunoassay of human granulocyte myeloperoxidase and its application to plasma. *J Immunol Meth* 1991; 137: 181-191.
- 18 **KLEBANOFF SJ, HAMON CB.** Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. *J Reticuloendothel Soc* 1972; 12: 170-196.
- 19 **KRAWISZ JE, SHARON P, STENSON WF.** Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterol* 1984; 87: 1344-1350.
- 20 **FAYMONVILLE ME, PINCEMAIL J, DUCHATEAU J, PAULUS JM, ADAM A, DEBY-DUPONT G, DEBY C, ALBERT A, LARBUISSON R, LIMET R, LAMY**

- M. Myeloperoxidase and elastase as markers of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102: 309-317.
- 21 **KING CC, JEFFERSON MM, THOMAS EL.** Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 293-302.
- 22 **MATHY-HARTERT M, BOURGEOIS E, GRULKE S, DEBY-DUPONT G, CAUDRON I, DEBY C, LAMY M, SERTEYN D.** Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leukocytes. *Can J Vet Res* 1998; 62: 127-132.
- 23 **DEBY-DUPONT G, GRULKE S, CAUDRON I, MATHY-HARTERT M, BENBAREK H, DEBY C, LAMY M, SERTEYN D.** Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radioimmunoassay and first results in septic pathologies. *Vet Immunol Immunopath* 1998; in press.
- 24 **SAS STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM,** Institute Inc., Cary, North Carolina, USA 1985.
- 25 **WEILAND JE, DABIS WB, HOLTER JF, MOHAMED JR, DORINSKY PM, GADEK JE.** Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 218-225.
- 26 **BENBAREK H, DEBY-DUPONT G, CAUDRON I, GRULKE S, DEBY C, LAMY M, SERTEYN D.** Interactions between lipopolysaccharides and blood factors on the stimulation of equine polymorphonuclear neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 64: 313-322.
- 27 **SEETHANATHAN P, BOTTOMS GD, SCHAFFER K.** Characterization of release of tumor necrosis factor, interleukin-1, and superoxide anion from equine white blood cells in response to endotoxin. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1221-1225.
- 28 **TRIM CM, BARTON MH, QUANDT JE.** Plasma endotoxin concentrations in anesthetized horses with colic. *Vet Surgery* 1997; 26, 2, 163
- 29 **MORRIS DD.** Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J Vet Intern Med* 1991; 5: 167-181.
- 30 **LARRICK JW, KUNKEL SL.** The role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the immunoinflammatory response. *Pharmaceut Res* 1988; 5: 129-139.
- 31 **CARRERAS GA, CATZ SD, PADERORA JJ, BOVERIS A.** Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *F.E.B.S. Lett* 1994; 341, 65-68.
- 32 **WEISS SJ, LAMPERT MB, TEST ST.** Long-lived oxidants generated by human neutrophils : characterization and bioactivity. *Science* 1983; 222: 625-628.
- 33 **WINTERBOURN CC, VAN DEN BERG JJ, RAITMAN E, KUYPERS FA.** Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Arch Biochem Biophys* 1992; 296: 547-555.
- 34 **KOPPENOL WH, MORENO JJ, PRYOR WA, ISCHIROPOULOS H, BECKMAN A.** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 834-842.
- 35 **VAN DER VLIET A, SMITH D, O'NEILL CA, KAUR H, PARCLEY-URMAR V, CROSS CE, HALLIWELL B.** Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem J* 1994; 303: 295-301.

PLASMA TRYPSIN LEVEL IN HORSES SUFFERING FROM ACUTE INTESTINAL OBSTRUCTION.

S. GRULKE*, M. GANGL*, G. DEBY-DUPONT+#, I. CAUDRON*, C. DEBY+ and D.
SERTEYN*,+

*Service d'Anesthésiologie Générale et de Pathologie Chirurgicale des Grands Animaux,
Faculté de Médecine Vétérinaire, +Centre Interdisciplinaire de Biochimie de l'Oxygène,
Recherche et Développement, # Service d'Anesthésie-Réanimation, Université de Liège, B
4000 Sart Tilman, Belgium.

The Veterinary Journal, in press

Summary

Gastro-intestinal disorders in horses leading to endotoxic shock could have further consequences on other splanchnic organs such as the pancreas as can be seen in humans suffering from septic shock. In this study, the range of enzymatically active trypsin (EAT) in healthy horses was established and is similar to the range observed in healthy humans. EAT values were determined in horses with acute abdominal crises on admission as well as during anaesthesia and in the post-operative phase.

A significant increase in plasma EAT was found in 59 % of the horses with surgical colic when compared to our established reference range. Significantly higher values were found in severe shock cases. When separated in groups according to the duration of colic before referral, significantly higher EAT values were observed in the non-survivor group compared to the survivor group of colics of short duration. EAT plasma values increased significantly during the post-operative phase, and were significantly higher in small intestine obstructions than in large bowel disorders. In human medicine, hypovolaemic or septic shock patients show an increase in pancreatic proteases. Splanchnic hypoperfusion during shock could lead to pancreatic damage resulting in trypsin liberation into the peritoneal space and an increase in plasma levels. Trypsin is able to activate inflammatory cascades and leucocytes and could play a role in multiple organ failure. Further studies are needed to evaluate the implications of changes in plasma trypsin in the disease process of equine acute abdomen and to demonstrate possible pancreatic damage.

Short running title : Plasma trypsin in equine acute abdomen.

Key words : trypsin, horse, intestinal obstruction, shock, pancreas

Introduction

In spite of a detailed understanding of equine gastro-intestinal disorders, intestinal obstruction, (especially strangulation obstruction), remains a major cause of morbidity and mortality, largely due to the rapid development of endotoxic shock. Necrosis of the intestinal wall permits the resorption of endotoxins (Moore *et al.*, 1981; Morris, 1991), which activate endothelial cells, monocytes and granulocytes. The activation of neutrophils has been demonstrated by the accumulation of neutrophils in the large colon of horses during low-flow ischaemia (Moore *et al.*, 1994), as well as the increase in chemiluminescence of isolated equine neutrophils in plasma in the presence of lipopolysaccharides (Benbarek *et al.*, 1997) and the increase of myeloperoxidase in the plasma of horses suffering from large intestine strangulation obstruction (Grulke *et al.*, 1999).

The local intestinal ischaemia and activation of granulocytes that occur during intestinal strangulation in horses could have further effects on the neighbouring organs of the splanchnic area such as the liver and the pancreas. Numerous studies with animal models (pigs, dogs and rats) and in human medicine have underlined the high sensitivity of the pancreas to local or systemic hypoperfusion and shock (Spath *et al.*, 1974; Warshaw & O'Hara, 1978; Florholmen *et al.*, 1985; Robert *et al.*, 1988; Florholmen *et al.*, 1988). Human clinical studies demonstrated that pancreatic damage occurred after hypovolaemic shock, surgery and during acute inflammatory diseases (Panebianco *et al.*, 1970; Tilney *et al.*, 1973; Deby-Dupont *et al.*, 1984; Nicod *et al.*, 1985; Fernandez-del Castillo *et al.*, 1991).

The pancreas is a major source of hydrolytic and proteolytic enzymes (trypsin, chymotrypsin, elastase, amylase, lipase, carboxypeptidase and others). These enzymes are normally released into the duodenum, but can reach the systemic circulation when the pancreas is damaged (Ohlsson & Tegner, 1973; Mayer *et al.*, 1985). Increased concentrations of trypsin or trypsinogen have been measured in plasma in human clinical conditions associated with inflammation and hypoperfusion (Deby-Dupont *et al.*, 1984; Nicod *et al.*, 1985; Fernandez-del Castillo *et al.*, 1991). The reabsorption of active trypsin from the intestine is also considered responsible for low concentrations of trypsin in normal plasma (Liebow & Rothman, 1975; Diamond, 1978). Endogenous pancreatic and plasma protease inhibitors like pancreatic secretory trypsin inhibitor

(PSTI) (Rinderknecht, 1986) and plasma α 2-macroglobulin and α 1-proteinase inhibitor (Lasson & Ohlsson, 1984) mediate normal protection against trypsin. However, when proteases are bound to α 2-macroglobulin, the enzymes remain active and are still able to exert their proteolytic activity against peptidic substrates (Barrett & Starkey, 1973; Largman *et al.*, 1977). Free or α 2- macroglobulin-bound trypsin activates the complement cascade (Lasson & Ohlsson, 1982), and circulating proteases act either directly on neutrophils to stimulate reactive oxygen production or indirectly by the way of blood component activation (Kitagawa *et al.*, 1980; Garcia-Szabo *et al.*, 1986). In human medicine, pancreatic proteases are known to exacerbate ischaemia-reperfusion injury of the small intestine (Parks *et al.*, 1985; Bounous, 1986). Trypsin and chymotrypsin can induce the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and thus induce the formation of free oxygen species (Montgomery *et al.*, 1992).

During intestinal strangulation obstructions and accompanying shock in horses, hypoperfusion of the splanchnic area is possible, which, together with the local inflammatory reaction and the neutrophil recruitment and stimulation, could induce pancreatic damage and release of pancreatic proteases into the peritoneal space. In cases of intestinal ischaemia, the permeability of the intestinal wall increases, in which case not only endotoxins but also digestive enzymes could enter the systemic circulation; this would also lead to increased plasma levels of trypsin with resultant effects on the systemic inflammatory response of the animal.

The aim of this study was to establish a reference range for plasma concentrations of enzymatically active trypsin (EAT) in the healthy horse and to test two sampling conditions. EAT levels in horses presenting with small and large intestine strangulation and non-strangulating obstructions were determined on admission. When permitted by the clinical working conditions, a follow-up of the EAT level during anaesthesia and the post-operative phase was also realised.

Materials and methods

Assay method and determination of reference range of EAT in healthy horses

The measurement of EAT is based on proteolytic cleavage by trypsin of a specific low molecular weight chromogenic substrate carbobenzyloxy-L-valyl-glycyl-L-arginine-4-nitranilide (Sigma-Aldrich) (Svendesen *et al.*, 1972; Lottenberg *et al.*, 1983). Trypsin cleaves the peptide chain at the level of the arginine-nitranilide bond and releases paranitraniline, which is then detected by spectrophotometry at 405 nm (25°C). The chromogenic substrate was used at the concentration of 4.6×10^{-4} M in 0.1 M Tris-HCl buffer, 0.02 M CaCl₂, at pH 8.0. For each plasma sample, 50 µL were used and the assays were performed in triplicate for each sample. The initial absorbance of the plasma sample was monitored at time 0 before addition of the chromogenic substrate (A₀) and subtracted from the final absorbance read 15 min after addition of the substrate (A₁₅). To quantify the active trypsin present in the sample, the [A₁₅-A₀] value was reported on a standard curve obtained in the same conditions with increasing amounts (from 2 to 50 ng/mL) of active bovine trypsin, and the results were expressed in ng trypsin/mL plasma. Protein values were measured for each plasma sample by a spectrophotometric method (Folin Ciocalteu) using equine serum albumin as the standard in order to take into account the possible concentration or dilution of the plasma and to correct the trypsin values if needed.

This EAT technique has previously been designed for trypsin measurement in human biological fluids and tested for specificity and sensitivity (Cullmann & Dick, 1981; Lottenberg *et al.*, 1983). EAT allows measurement of free trypsin and trypsin bound to α₂-macroglobulin, but does not detect the trypsinogen or trypsin bound to α₁-proteinase inhibitor in which the catalytic site of the enzyme is masked. In order to assess the precision and the reproducibility of the method, 10 normal and 10 pathological plasma samples were measured eight times and the calculated coefficient of variation (i.e. SD/mean value, expressed in %) ranged between 0.5 and 5 %. In order to confirm the specificity, the chromogenic substrate was used with other plasma proteases derived from the coagulation and fibrinolytic cascades: no reaction was observed (data not shown). Similarly, chymotrypsin, elastase, collagenase, cathepsins and the proteases of the complement cascade were tested and also did not interfere with

the assay (data not shown). Normal values of trypsin in equine plasma (obtained from blood samples drawn in heparin) were established under our normal working conditions. Blood samples were drawn from 38 healthy warmblood horses (mean age : 12 years, range five to 17 years; 29 geldings, nine mares), which were housed and fed in similar conditions with one to two hours of daily training. Plasma was isolated by immediate centrifugation and stored frozen (-20°C) until assayed. In order to test the effect of the sampling conditions, 16 blood samples taken from normal horses were divided into two halves. Samples in the first half were immediately centrifuged but for the other half centrifugation was delayed (4 h). The EAT values measured in the two conditions were compared.

Acute intestinal pathology

Thirty-seven horses diagnosed with surgical colic after admittance to Large Animal Surgery at the University of Liège were used in this study. The horses were aged from 15 months to 25 years (mean age : 10 years), weighing 333 to 664 kg (average 525 kg). The group consisted of 22 mares, 12 geldings and three stallions. There were 28 warmbloods, three ponies, two Arabians, two quarter-horses, a draft horse, and a thoroughbred. The duration of colic before referral to our clinic was also recorded.

After clinical examination, a shock score (SS) was attributed to each case. The score was based on clinical and biochemical parameters such as heart rate, respiratory rate, systolic arterial pressure, packed cell volume, blood lactate concentration and blood urea nitrogen which were then classified in four categories (Grulke *et al.*, 2000). Blood samples were taken for biochemical analysis and for EAT assay at the presentation of each horse (phase 1).

Five horses were euthanized before treatment on the request of the owner and post mortem examinations were performed. All other horses were anaesthetised for ventral midline celiotomy (premedication with xylazine, induction by guaifenesine and thiamylal [n = 12] or midazolam and ketamine [n = 20]). Anaesthesia was maintained by isoflurane in oxygen. The exact localisation and the type of the obstruction were determined. The horses presenting with severe intestinal lesions not amenable to surgery (n = 6) were euthanized during anaesthesia. The others (n = 26) received

intensive care until recovery of normal intestinal function and normal cardio-vascular status. Several horses (n = 7) developed irreversible complications leading to euthanasia (from 6 h to 15 days after the end of anaesthesia).

Progression during anaesthesia and the post-operative period

In 22 horses (17 survivors and 5 non-survivors), blood samples were taken at presentation (phase 1) and also during anaesthesia (anaesthesia = phase 2). Clinical conditions also permitted blood sampling every 8 h during the intensive care period after the surgery (corresponding to phase 3) until euthanasia or until recovery of normal intestinal function and normal cardiovascular status (for about four to five days after surgery) and at least five to 10 samples were assayed for EAT level. In order to compare the EAT levels, the peak values of each phase were taken into account. The main post-operative complication and its intensity were recorded (one means that it rapidly responded to treatment, two means that it is a more severe complication responding only after several days to treatment, three means a fatal complication leading to euthanasia). The period of recovery of normal intestinal function and of normal cardiovascular status was also noted (in hours after the end of anaesthesia).

Statistical analysis

The reference range of EAT in healthy animals, the effect of delayed centrifugation as well as the EAT values on admission of the horses suffering from intestinal obstruction above the maximal reference range of healthy horses were compared by Kruskal Wallis, non-parametric ANOVA test. Results were considered significant when $p < 0.05$. EAT means of survivors and non-survivors in the different colic duration groups were also compared by Kruskal Wallis, non-parametric ANOVA test and results were deemed significant when $p < 0.05$. The remaining data of serial EAT values were studied by a general linear model procedure (analysis of variance) to test the effect of the phase, the localisation of the obstruction, the type of the obstruction and the final outcome (survivor or non-survivor) (SAS, 1985). The least square means (LSM) were used to compare these differences and results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Reference ranges in healthy animals

The normal mean (\pm SD) EAT value obtained from 38 healthy horses was 28.5 (\pm 19.2) ng/mL, (range 3 to 78 ng/mL), which was similar to the mean normal value obtained in humans (25.2 \pm 12.8 ng/mL; range: 6 to 81 ng/mL) (Deby-Dupont *et al.*, 1988a). The upper reference range can be considered as the mean + 3 standard deviations (SD), i.e. a maximal normal value of 86 ng/mL. In the cohort of EAT values measured in normal horses, no higher values were observed related to sex or age of the horses.

Samples from the 16 horses, which had delayed centrifugation (4 h) prior to assay showed no significant difference between the values of EAT means (28.9 ng/mL \pm 16.1 for immediate centrifugation versus 34.3 ng/mL \pm 20.9 for delayed centrifugation of the same 16 samples). No significant difference was observed between these results and the reference range (data not illustrated).

Acute intestinal pathology

The classification for the shock score was as follows: 17 horses had shock score of grade I, 10 horses were grade II, seven horses were grade III and three horses were grade IV (see Table I). For statistical evaluation, the horses with shock scores of grades III and IV were unified. The small intestine was involved in 22 cases and the remaining 15 cases involved the large intestine. EAT values are mentioned in Table I for the surviving and non-surviving small and large intestine cases. Because of the large variability and the small number of cases in some categories, statistical analysis was not done on these EAT means.

Table I.

Number of surviving and non-surviving horses within the four grades of shock score (SS) presenting small (SI) or large intestine (LI) obstruction and the mean enzymatically active trypsin (m EAT) value of each group in ng/mL \pm SD.

	SS I (mEAT)	SS II (mEAT)	SS III (mEAT)	SS IV (mEAT)	Total
SI survivors	5 (47 \pm 27.1)	3 (45.3 \pm 67.3)	1 (277)	0	9
SI non-survivors	4 (112.5 \pm 54)	4 (142.8 \pm 45.5)	2 (462.5 \pm 229.8)	3 (250.3 \pm 46.2)	13
LI survivors	7 (66.9 \pm 56.2)	3 (64.7 \pm 70.1)	0	0	10
LI non-survivors	1 (208)	0	4 (191.8 \pm 66.4)	0	5
Total	17	10	7	3	37

The EAT values at admission were higher than the maximal physiological value in 22 of the cases with surgical colic (59 %), with a mean value of $201.8 \text{ ng/mL} \pm 114.7$, (range 100 to 625 ng/mL). The mean value was significantly different from the reference range of the normal horses ($p < 0.05$). Furthermore, the mean value of EAT for small intestinal obstruction was $217.2 \text{ ng/mL} \pm 138.2$, compared to $174.9 \text{ ng/mL} \pm 51.9$ for large intestinal obstructions, but statistical analysis showed no significant difference between the mean EAT values on admission of the small and large intestinal obstructions groups.

The duration of colic before referral was 2 to 12 hours (group 1) for 20 horses with 13 survivors, 13 to 24 h (group 2) for 13 horses with five survivors and 25 to 48 hours (group 3) for four horses with only one survivor. EAT means were established for these groups and there was an increase in EAT with longer duration of colic especially for the non-survivor group. A significant difference in EAT means was found between surviving horses in group 1 ($62 \text{ ng/mL} \pm 76.1$) and groups 2 and 3 of non-surviving horses (mean EAT value of 187.5 ± 74.1 for group 2 and of 401.7 ± 193.7 for group 3) ($P < 0.05$).

When considering all the cases and the comparison of EAT in the different shock scores, there was a significant difference of EAT between grade I or II compared with grade III/IV shock score ($80.1 \text{ ng/mL} \pm 35.3$ for SS I or $90.1 \text{ ng/mL} \pm 70$ for SS II and $272 \text{ ng/mL} \pm 137.5$ for SS III/IV; $P < 0.01$) and for SS III/IV all the values were above the maximal physiological value (from 120 to 625 ng/mL).

Progression of EAT during anaesthesia and the post-operative period

In the 22 cases where the evolution of EAT values was studied (see Table II for details), a significant difference was observed relating to phases. The EAT peak value of P3 appeared from 12 to 60 h after the surgery. Phase 3 showed significant increases of EAT in small and large intestine obstructions ($p = 0.0001$). There was also a significant difference according to the site of obstruction. Small intestinal obstructions showed significantly higher EAT values; LSM: 440.8 ng/mL in phase 3 and 186.8 ng/mL for the same phase in the large intestinal obstructions ($p = 0.0034$). No significant differences were shown between survivors and non-survivors nor between strangulation and non-strangulating obstructions during the post-operative phase.

Table II.

Horses 1 to 22 of the group given a serial EAT assay with type of lesion, type of surgery in addition to exploration and repositioning, the corresponding initial shock score (SS), the period of recovery of normal intestinal function and cardio-vascular status, the type and intensity of complications (0 = no complication; 1 = minor complication; 2 = severe complication; 3 = fatal complication), the EAT peak value (ng/mL) at admission (P1), during anaesthesia (P2) and during intensive care period (P3).

HN	Type of lesion	Type of surgery	Initial SS	Recovery period	Type (intensity) of complications	EAT (ng/mL)		
						P1	P2	P3
1	Ileal impaction	massage	1	96	Ileus,1	56	139	261
2	Strang. lipoma	enterectomy	1	19	Phlebitis, 1	48	147	156
3	Inc. EF ileum		1	44	Ileus, 1	6	6	167
4	Inc. EF ileum	decompression massage	1	40	Peritonitis, 1	81	117	1056
5	Inc. EF ileum	decompression massage	1	144	Ileus, 2	44	50	317
6	Strang. lipoma	enterectomy	2	43	Peritonitis, 1	8	31	214
7	Inc EF SI	decompression massage	2	184	Ileus, 2	123	134	240
8	Ileal impaction	enterotomy	2	62	Adhesions, 2	56	86	833
9	SI volvulus	decompression massage	3	103	Ileus, shock, 2	277	100	1111
10	LI torsion	needle aspiration	1	38	none	63	106	230
11	LI torsion	needle aspiration	1	17	none	31	67	167
12	LI torsion	adhesion resection	1	20	Peritonitis, 1	77	95	146
13	LI displ.		1	20	Peritonitis, 1	11	22	128
14	LI displ.	needle aspiration	1	12	Adhesions, 2	6	33	467
15	LI torsion		1	80	Ileus, 2	141	113	205
16	LI torsion	needle aspiration	2	10	Acidosis, 1	39	11	139
17	LI displ.	needle aspiration	2	95	Ileus, 2	11	17	69
18	Strang. lipoma	enterectomy	1	-	Ileus, 3	56	39	911
19	Inc. EF SI	enterectomy	1	-	Shock, 3	103	90	137
20	Inc. EF SI		2	-	Shock, 3	100	94	122
21	LI displ.	needle aspiration	1	-	Ileus, 3	208	183	232
22	LI torsion	needle aspiration	3	-	Shock, 3	120	208	103

Inc. EF : incarceration into the epiploic foramen ; Strang.: strangulating ; SI : small intestine ; LI : large intestine; displ. : displacement

Discussion

Trypsin can be measured by immunological or enzymatic techniques. The immunological method allows measurement of all the circulating forms of trypsin (trypsinogen, free trypsin, trypsin-inhibitor complexes) except the α_2 -macroglobulin-trypsin complexes. The immunological technique needs specific antibodies obtained against purified trypsin, but the equine enzyme has never been purified in sufficient amounts to be used for the design of an immunological method. With the enzymatic method (EAT), free trypsin and trypsin bound to α_2 -macroglobulin are measured. We have used the EAT technique, which is species-independent and does not interfere with other plasma proteases arising from the coagulation and complement cascade or released from activated phagocytes (high specificity). Moreover, in this way, we measured those forms of the enzyme with the greatest potential to cause damage. We have established a normal mean value for equine EAT values with a reference range from 0 to 86 ng/mL (mean value \pm 3 SD). Values above 86 ng/mL can be considered pathological, with a 0.01 % risk of error (upper 99 % confidence limit).

Equine plasma EAT values have not been reported previously; therefore our results can only be compared to human data. In healthy humans, EAT measurements also extend over a large range, without significant differences linked to sex or age (Deby-Dupont *et al.*, 1988a). It has been pointed out that trypsin is not normally present in blood, but has, unexpectedly, been found in the plasma of normal humans (Borgström & Ohlsson, 1976; Geokas *et al.*, 1979, Carrere *et al.*, 1983). Its presence in blood was attributed to the reabsorption of the active enzyme from the intestine (Liebow & Rothman, 1975; Diamond, 1978). When it reaches the bloodstream, trypsin is mainly complexed by α_2 -macroglobulin, a circulating form that is measured by the EAT technique (Geokas *et al.*, 1979; Lasso & Ohlsson, 1984). The amount of trypsin reabsorbed from the intestine will vary with the digestive status, which could explain the large range of values observed in humans (Florholmen *et al.*, 1984) as well as in horses.

Increased levels of enzymatically active trypsin were found on admission in 59 % of the cases of acute abdominal disease and in nearly all of the horses during the postoperative phase. The enzymatic technique, albeit specific for trypsin, cannot distinguish between EAT coming from a pancreatic lesion or from intestinal reabsorption. However,

increased levels of EAT were found not only in horses with small intestinal necrosis, where intestinal absorption of EAT is possible, but also in cases with large intestinal obstruction. Pancreatic proteases are likely to be inactivated during their transit through the small intestine (Moore *et al.*, 1995) and cannot be absorbed via devitalised large intestine. Even in cases of non-strangulating obstruction and during the post-operative phase (see for example, horses 8 and 14 at 60 h after surgery, see Table II), elevated EAT levels are observed in surviving horses, suggesting that pancreatic damage is the source of the EAT in plasma.

We also observed higher EAT values in horses with severe shock symptoms than in those not exhibiting signs of endotoxic shock. In human medicine, it is recognized that the pancreas is an organ highly sensitive to hypoperfusion, and pancreatic lesions have been observed in animals and humans after hypovolaemic or septic shock (Spath *et al.*, 1974; Warshaw & O'Hara, 1978; Becker & Stollhoff, 1985). In intensive care patients, trypsin release into the blood has been reported, persisting for several days or weeks, rarely leading to more severe pancreatic alterations (Deby-Dupont *et al.*, 1984; Fernandez-del Castillo *et al.*, 1991). These elevated trypsin levels were more important and more frequent in septic patients (Deby-Dupont *et al.*, 1984) and were attributed to an inflammatory reaction in the pancreas subsequent to splanchnic inflammation and hypoperfusion or even to local disturbance of the pancreas during surgery (Tilney *et al.*, 1973; Warshaw & O'Hara, 1978; Morrissey *et al.*, 1980; Robert *et al.*, 1988) leading to the concept of “shock pancreas” (Deby-Dupont *et al.*, 1988b). These observations have been confirmed by recent studies in human medicine which showed severely affected exocrine pancreatic function in septic shock patients with diminished exocrine secretion of the gland, in the absence of severe histological lesions (Tribl *et al.*, 2000). Other studies have shown that ischaemia-reperfusion injury of the pancreas induced apoptosis of acinar cells and resembled many features of acute pancreatitis (Fujimoto *et al.*, 1997). This may lead to cell damage and subsequent further activation of other proteases (Lerch & Gorelick, 2000; Sakorafas & Tsiotou, 2000). Pancreatitis is not a commonly reported disease in equine medicine and only a few case reports have been described (Baker, 1978; Lilley & Beeman, 1981; Hamir, 1987). Further studies are necessary in order to examine the existence of “sub-clinical” pancreatic lesions in horses suffering from intestinal obstruction and endotoxic shock by histological analysis of the pancreas of non-survivors.

When cases were separated according to the duration of colic, increased EAT levels were found with increasing colic duration and in non-survivors. As trypsin initially binds to α 1-proteinase

inhibitor (Beatty *et al.*, 1982), a complex that is not detected by the enzymatic assay, this can contribute to lower EAT values in the short duration group. Because of the large variability of clinical cases, it is difficult to link increased EAT levels directly to an increased morbidity. But, it can be assumed that the presence of active trypsin in the blood will have further effects on the evolution of the disease. In pancreatic diseases, trypsinogen is activated in large quantities in the pancreas (Fernandez-del Castillo *et al.*, 1994), and when it is released into systemic circulation, trypsinogen is capable of self-activation (Kassel & Kay, 1973; Rinderknecht, 1986) and can also be activated by neutrophils (Hartwig *et al.*, 1999). Trypsin is able to induce pulmonary vascular permeability and leucocyte margination (Tahamont *et al.*, 1982), to activate the complement cascade which leads to leucocyte recruitment (Horn *et al.*, 1980; Acioli *et al.*, 1997) and to increase the expression of adhesion molecules on neutrophils (Hartwig *et al.*, 2001). In acute equine abdominal cases, activation of neutrophils has also been indicated by increases of myeloperoxidase in the plasma of horses suffering from large intestinal strangulation obstruction (Grulke *et al.*, 1999) and trypsin could play a role in this activation. Lundberg *et al.* (2000) demonstrated the link between proteolytic enzymes like trypsin, released during acute pancreatitis, and the inflammatory cytokine cascade. Trypsin was found to stimulate peritoneal macrophages (*in vitro* and *in vivo* in rats) to produce and to release TNF-alpha and IL-1 beta. These different effects of pancreatic proteases could trigger the development of other organ failure in human intensive care patients (Imrie *et al.*, 1977; Hartwig *et al.*, 1999).

The higher EAT levels in the small intestine group than in the large intestine group could be explained by the more severe shock symptoms of the small intestine group. Several pathologies, such as incarceration of the small intestine into the epiploic foramen or volvulus of the anterior small intestine could produce a direct compression of the pancreas as well as manipulation during surgery inducing pancreatic damage. Further studies are needed in order to evaluate possible pancreatic damage related to equine acute abdomen and to determine the effects of abnormal levels of blood trypsin in the evolution of the abdominal disease.

Acknowledgements

This work was supported by a FRSM (National Fund for Scientific Medical Research – Belgium) grant n° 3.4615.98.

References

ACIOLI, J.M., ISOBE, M. & KAWASAKI, S. (1997). Early complement system activation and neutrophil priming in acute pancreatitis: participation of trypsin. *Surgery* **122**, 909–917.

BAKER, R.H. (1978). Acute necrotizing pancreatitis in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **172**, 268-270.

BARRETT, A. & STARKEY, P. (1973). The interaction of α 2-macroglobulin with proteinases. *Biochemical Journal* **133**, 709-724.

BEATTY, K., TRAVIS, J. & BIETH, J. (1982). The effect of α 2-macroglobulin on the interactions of α 1-proteinase inhibitor with porcine trypsin. *Biochimica et Biophysica Acta* **704**, 221-226.

BECKER, V. & STOLLHOFF, K. (1985). Shock and terminal pancreatitis. *Pathology, Research and Practice* **179**, 512-516.

BENBAREK, H., DEBY-DUPONT, G., CAUDRON, I., DEBY, C., LAMY, M. & SERTEYN, D. (1997). Failure of lipopolysaccharides to directly trigger the chemiluminescence response of the isolated equine polymorphonuclear leucocytes. *Veterinary Research Communications* **21**, 477-482.

BORGSTRÖM, A. & OHLSSON, K. (1976). Radioimmunological determination and characterization of cathodal trypsin-like immunoreactivity in normal human plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **36**, 809–814.

BOUNOUS, G. (1986). Pancreatic proteases and oxygen-derived free radicals in acute ischemic enteropathy. *Surgery* **99**, 92-94.

CARRERE, J., GRATAROLI, R., MARFIN, J., FERRUA, B., THOUVENOT, J.P. & FIGARELLA, C. (1983). Non-competitive enzyme immunoassay of human trypsin 1. *Journal of Immunological Methods* **60**, 235–242.

CULLMANN, W. & DICK, W. (1981). A chromogenic assay for evaluation of 2-macroglobulin level in serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **19**, 287-290.

DEBY-DUPONT, G., HAAS, M., PINCEMAIL, J., BRAUN, M., LAMY, M., DEBY, C. & FRANCHIMONT, P. (1984). Immunoreactive trypsin in the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine* **10**, 7-12.

DEBY-DUPONT, G., REYNAERT, M., LAMY, M. & FRANCHIMONT, P. (1988a). Justification biochimique du drainage du canal thoracique au cours de la pancréatite nécrotique hémorragique. *Acta Gastro-Enterologica Belgica* **L1**, 31-40.

DEBY-DUPONT, G., FAYMONVILLE, M.E., DAMAS, F., DAMAS, P. & LAMY, M. (1988b). Shock pancreas. *Intensive Care News* **1**, 1-6.

DIAMOND, J.M. (1978). Reabsorption of digestive enzymes: playing with poison. *Nature* **271**, 112-112.

FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., HARRINGER, W., WARSHAW, A.L., VLAHAKES, G.J., KOSKI, G., ZASLAVSKY, A.M. & RATTNER, D.W. (1991). Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *The New England Journal of Medicine* **325**, 382-387.

FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., SCHMIDT, J., WARSHAW, A.L. & RATTNER, D.W. (1994). Interstitial protease activation is the central event in progression to necrotizing pancreatitis. *Surgery* **116**, 497-504.

FLORHOLMEN, J., BURHOL, P.G. & JORDE, R. (1984). Postprandial response and diurnal variation of serum cationic trypsin-like immunoreactivity in man. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **19**, 622-625.

FLORHOLMEN, J., REVHAUG, A., BURHOL, P.G., GIERSCKY, K.E. & OLSEN, R. (1985). Effect of intravenous and intraduodenal administration of Escherichia coli endotoxin on the porcine pancreas as evaluated by changes in the serum cationic trypsin-like immunoreactivity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **20**, 279-284.

FLORHOLMEN, J., LINDAL, S., RØKKE, O., OLSEN, R., BURHOL, P.G. & REVHAUG, A. (1988). Effects of endotoxin on the pancreatic ultrastructure. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **96**, 991-996.

FUJIMOTO, K., HOSOTANI, R., WADA, M., LEE, J., KOSHIBA, T., MIYAMOTO, Y., DOI, R. & IMAMURA, M. (1997). Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats : identification of acinar cell apoptosis. *Journal of Surgical Research* **71**, 127-136.

GARCIA-SZABO, R.R., JONHSON, A. & MALIK, A.B. (1986). Leukocytes are required for the trypsin-induced increase in lung vascular permeability. *American Journal of Pathology* **124**, 377-383.

GEOKAS, M.C., LARGMAN, C., BRODRICK, J.W. & JOHNSON, J.H. (1979). Determination of human pancreatic cationic trypsinogen in serum by radioimmunoassay. *American Journal of Physiology* **236** (*Endocrinology and Metabolism* **5**), E77-E83.

GRULKE, S., BENBAREK, H., CAUDRON, I., DEBY-DUPONT, G., MATHY-HARTERT, M., FARNIR, F., DEBY, C., LAMY, M. & SERTEYN D. (1999). Plasma myeloperoxidase level and polymorphonuclear leucocyte activation in horses suffering from large intestinal obstruction requiring surgery : preliminary results. *Canadian Journal of Veterinary Research* **63**, 142-147.

GRULKE, S., GANGL, M., CAUDRON, I. & SERTEYN, D. (2000). Etude rétrospective de 206 cas de pathologie chirurgicale intestinale chez le cheval : incidence, diagnostic, pronostic et complications. *Annales de Médecine Vétérinaire* **144**, 319-328.

HAMIR, A.N. (1987). Verminous pancreatitis in a horse. *Veterinary Record* **121**, 301-302.

HARTWIG, W., WERNER, J., JIMENEZ, R.E., Z'GRAGGEN, K., WEIMANN, J., LEWANDROWSKI, K.B., WARSHAW, A.L. & FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C. (1999). Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute pancreatitis-associated lung injury. *American Journal of Physiology* **277** (*Gastrointestinal and Liver Physiology* **40**), G1008–G1016.

HARTWIG, W., JIMENEZ, R.E., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., KELLIHER, A., JONES, R. & WARSHAW, A.L. (2001). Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Annals of Surgery* **233**, 371-378.

HORN, J.K., RANSON, J.H., GOLDSTEIN, I.M., WEISSLER, J., CURATOLA, D., TAYLOR, R. & PEREZ, H.D. (1980). Evidence of complement catabolism in experimental acute pancreatitis. *American Journal of Pathology* **101**, 205–216.

IMRIE, C.W., FERGUSON, J.C., MURPHY, D. & BLUMGART, L.H. (1977). Arterial hypoxia in acute pancreatitis. *British Journal of Surgery* **64**, 185–188.

KASSELL, B. & KAY, J. (1973). Zymogens of proteolytic enzymes. *Science* **180**, 1022–1027.

KITAGAWA, S., TAKAKU, F. & SAKAMOTO, S. (1980). Evidence that proteases are involved in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Journal of Clinical Investigation* **65**, 74-81

LARGMAN, C., JOHNSON, J.H., BRODRICK, J.N. & GEOKAS, H.C. (1977). Proinsulin conversion to desalanyl insulin by α 2-macroglobulin-bound trypsin. *Nature* **269**, 168-170.

LASSON, A. & OHLSSON, K. (1982). An in vitro study of the influence of plasma protease inhibitors and aprotinin on trypsin-induced C3 cleavage in human serum. *Biochimica et Biophysica Acta* **709**, 227-233.

LASSON, A. & OHLSSON, K. (1984). Protease inhibitors in acute human pancreatitis. Correlation between biochemical changes and clinical course. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **19**, 779–786.

LERCH, M.M. & GORELICK, F.S. (2000). Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Medical Clinics of North America* **84**, 549-563.

LIEBOW, C. & ROTHMAN, S.S. (1975). Enteropancreatic circulation of digestive enzymes. *Science* **189**, 472-474.

LILLEY, C.W. & BEEMAN, G.M. (1981). Gastric dilatation associated with acute necrotizing pancreatitis. *Equine Practice* **3**, 8-15.

LOTTENBERG, R., HALL, J.A., BLINDER, M., BINDER, E.P. & JACKSON, C.M. (1983). The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* **742**, 539-557.

- LUNDBERG, A.H., EUBANKS, J.W.^{3rd}, HENRY, J., SABEK, O., KOTB, M., GABER, L., NORBY-TEGLUND, A. & GABER, A.O. (2000). Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas* **21**, 41-51.
- MAYER, A.D., AIREY, M., HODGSON, J. & MCMAHON, M.J. (1985). Enzyme transfer from pancreas to plasma during acute pancreatitis. The contribution of ascitic fluid and lymphatic drainage of the pancreas. *Gut* **6**, 876-881.
- MONTGOMERY, A., BORGSTRÖM, A. & HAGLUND, U. (1992). Pancreatic proteases and intestinal mucosal injury after ischemia and reperfusion in the pig. *Gastroenterology* **102**, 216-222.
- MOORE, J.N., WHITE, N.A., BERG, J.N., TRIM, C.M. & GARNER, H.E. (1981). Endotoxemia following experimental intestinal strangulation obstruction in ponies. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **45**, 330-332.
- MOORE, R.M., BERTONE, A.L., BAILEY, M.Q., MUIR, W.W. & BEARD, W.L. (1994). Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. *American Journal of Veterinary Research* **55**, 1454-1463.
- MOORE, R.M., MUIR, W.W. & GRANGER, D.N. (1995). Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions : A review and its implications in the horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **9**, 115-132.
- MORRIS, D.D. (1991). Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **5**, 167-181.
- MORRISSEY, R., BERJ, J.E., FRIDHANDLER, L. & PELOT, D. (1980). The nature and significance of hyperamylasemia following operation. *Annals of Surgery* **180**, 67-71.
- NICOD, L., LEUENBERGER, P., SEYDOUX, C., FEY, F., VAN MELLE, G. & PERRET, C. (1985). Evidence for pancreas injury in adult respiratory distress syndrome. *The American Review of Respiratory Disease* **131**, 696-699.
- OHLSSON, K. & TEGNER, H. (1973). Experimental pancreatitis in the dog. Demonstration of trypsin in ascitic fluid, lymph and plasma. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **8**, 129-133.
- PANEBIANCO, A.C., SCOTT, S.M., DART, C.H. JR, TAKARO, T. & ECHEGARAY, H.M. (1970). Acute pancreatitis following extracorporeal circulation. *Annals of Thoracic Surgery* **9**, 562-568.
- PARKS, D.A., GRANGER, D.N., BULKLEY, G.B. & SHAH, A.K. (1985). Soybean trypsin inhibitor attenuates ischemic injury to the feline small intestine. *Gastroenterology* **89**, 6-12.
- RINDERKNECHT, H. (1986). Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Digestive Diseases and Sciences* **31**, 314-321.

ROBERT, J., TOLEDANO, A.E., TOTH, K.S., PREMUS, G. & DREILING, D.A. (1988). Hypovolemic shock, pancreatic blood flow, and pancreatitis. *International Journal of Pancreatology* **3**, 283-292.

SAKORAFAS, G.H. & TSIOTOU, A.G. (2000). Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis : current concepts. *Journal of Clinical Gastroenterology* **30**, 343-356.

SPATH, J.A., GORCZYNSKI RJ, LEFER AM. (1974). Pancreatic perfusion in the pathophysiology of haemorrhagic shock. *Journal of Physiology* **226**, 443-451.

SVENDESEN, L., BLOMBACK, B., BLOMBACK, M. & OLSSON, P.I. (1972). Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes. *Thrombosis Research* **1**, 267-278.

TAHAMONT, M.V., BARIE, P.S., BLUMENSTOCK, F.A., HUSSAIN, M.H. & MALIK A.B. (1982). Increased lung vascular permeability after pancreatitis and trypsin infusion. *American Journal of Pathology* **109**, 15-26.

TILNEY, N.L., BAILEY, G.L. & MORGAN, A.P. (1973). Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms. *Annals of Surgery* **178**, 117-122.

TRIBL, B., MADL, C., MAZAL, P.R., SCHNEIDER, B., SPITZAUER, S., VOGELSANG, H. & GANGL, A. (2000). Exocrine pancreatic function in critically ill patients : Septic shock versus non-septic patients. *Critical Care Medicine* **28**, 1393-1398.

WARSHAW, A.L. & O'HARA, P.J. (1978). Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Annals of Surgery* **188**, 197-201.

Products

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (1985). SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

EQUINE TRYPSIN PURIFICATION, DEVELOPMENT OF A RADIO-IMMUNOASSAY AND FIRST RESULTS IN EQUINE INTESTINAL OBSTRUCTION.

Grulke Sigrid^{*1,2}, Deby-Dupont Ginette^{2,3}, Gangl Monika¹, Deby Carol², Lamy Maurice^{2,3}, Sertejn Didier^{1,2}.

¹Anesthésiologie générale et Pathologie chirurgicale des Grands Animaux, B41, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, 4000 Sart Tilman, Belgique

²Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement, B6a, Institut de Chimie, Université de Liège, 4000 Sart Tilman, Belgique.

³Anesthésie-Réanimation, Centre Hospitalier Universitaire, B35, Faculté de Médecine, Université de Liège, 4000 Sart Tilman, Belgique

Soumis pour publication

Short running title

Immunoreactive trypsin assay in equine plasma

Summary

Shock is accompanied by generalized splanchnic hypoperfusion, and splanchnic organs like pancreas can be damaged as shown in animal experimental models and in humans by the presence of high plasma concentrations of trypsin and other pancreatic enzymes. In order to measure equine trypsin in plasma by a radioimmunoassay technique (RIA), trypsin has been purified from equine pancreas by extraction in acid milieu, followed by ammonium sulfate precipitations and dialysis. Gel filtration chromatography and affinity chromatography permitted final purification (purity $\geq 96\%$). Gel polyacrylamide electrophoresis showed a monomeric enzyme with a molecular weight of 24,000 Da. Equine trypsin had similar molecular weight to human trypsin but showed autodegradation even when stored at -70°C . The purified equine trypsin served for the immunization of rabbits for obtaining of specific antibodies. The labelled antigen was obtained by radioactive labelling (^{125}I iodine) of equine trypsin. The immunological assay was based on the binding of trypsin to the antibody followed by the separation of the antigen-antibody complex by immunoprecipitation in the presence of sheep anti-rabbit gammaglobulins and assay of the radioactivity in the precipitate. Competition between labelled and unlabelled antigen for a fixed amount of antibodies allowed to obtain a reference curve and to measure trypsin in unknown equine plasma samples. The RIA showed good sensitivity, specificity, precision, accuracy and reproducibility. A reference range of immunoreactive trypsin (IRT) in healthy horses ($n = 20$) was 30.01 ± 6.84 ng/mL (upper confidence limit 50.52 ng/mL; $p < 0.01$). Three horses with non strangulating intestinal obstruction without shock signs showed IRT values within normal limits whereas 5 of 7 horses with strangulation obstruction showed IRT levels above the upper confidence limit. The reference range was similar to human normal values. The assay of immunoreactive trypsin was complementary to the one of trypsin activity and permitted the detection of the total amount of plasma trypsin.

Key words

equine trypsin/purification/radioimmunoassay/reference range/intestinal obstruction

Résumé – Purification et dosage radioimmunologique de la trypsine équine et premiers résultats lors d'obstruction intestinale.

L'état de choc s'accompagne d'une hypoperfusion splanchnique généralisée et des organes splanchniques comme le pancréas sont lésés, comme il a été démontré lors d'études expérimentales et chez l'homme par une augmentation des enzymes pancréatiques dans la circulation générale. Afin de mesurer la trypsine équine par un dosage radioimmunologique (RIA), l'enzyme a été purifiée à partir de pancréas équin par une extraction en milieu acide, suivie de deux étapes de précipitation au sulfate ammonique et d'une étape de dialyse. Une chromatographie de filtration sur gel et une chromatographie d'affinité ont permis d'obtenir une enzyme pure à $\geq 96\%$. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide montre une enzyme monomérique d'un poids moléculaire de 24000 Da. La trypsine équine possède des caractéristiques similaires à celles de l'enzyme humaine, mais s'autodégrade plus facilement, même si elle est conservée à -70°C . La trypsine purifiée a permis l'immunisation du lapin afin d'obtenir des anticorps spécifiques. L'antigène marqué est obtenu par marquage radioactif de la trypsine équine à l' ^{125}I . Le dosage immunologique est basé sur la fixation de la trypsine marquée à l'anticorps, suivie de la séparation du complexe antigène-anticorps par immunoprécipitation par des anticorps antigammaglobulines de lapin obtenus chez le mouton, et de la mesure de la radioactivité dans le précipité. Le RIA présente une bonne sensibilité, spécificité, précision, exactitude et reproductibilité. L'intervalle de référence ($n = 20$) est $30,01 \pm 6,84$ ng/mL (intervalle de confiance supérieur 50,52 ng/ml, $p < 0,001$). Trois chevaux souffrant d'obstruction intestinale non étranglée présentent des taux normaux de trypsine alors que 5 sur 7 chevaux en obstruction intestinale étranglée montrent des taux supérieurs à la limite maximale. Les valeurs normales sont similaires à celles mesurées chez l'homme. Le dosage radioimmunologique de la trypsine est complémentaire à la mesure de son activité, et la combinaison des deux méthodes permet la détection de toutes les formes plasmatiques de la trypsine.

Mots clefs

**Trypsine équine/purification/dosage radioimmunologique/intervalle de référence/
obstruction intestinale**

1. INTRODUCTION

Hypovolaemic and endotoxic shock following intestinal obstruction or severe sepsis may lead to generalized hypoperfusion to which several organs (central nervous system, lungs, heart, kidneys) are very susceptible [26, 29, 37]. Hypoperfusion induces a systemic reaction with leukocyte activation and a generalized inflammation that finally leads to multiple organ failure [2]. The organs of the splanchnic area are also very susceptible to hypoperfusion, although often clinically silent. Several experimental studies have shown the particular susceptibility of the pancreas to hypoperfusion with a deep fall of capillary blood flow, an increase of pancreatic enzymes in the general circulation and histo-pathological alterations of the pancreas [11, 12, 13, 14, 21]. Similar findings have been made for humans with severe trauma and hypovolaemic or septic shock [5, 18, 33, 44, 45]. Splanchnic hypoperfusion and systemic inflammatory reaction contribute to pancreatic damage with leukocyte accumulation in pancreatic capillaries and anoxia of highly active metabolic rate cells of exocrine pancreas. Recently digestive enzymes were found to induce the formation of small molecular weight cell activators that may play an important role in the development of microcirculatory dysfunction and multiple organ failure [30].

In horses, strangulating intestinal obstruction often leads to the development of endotoxic shock [32, 38]. Due to the alteration of intestinal permeability, endotoxins enter the general circulation [31], but the entry of digestive enzymes that has been recognized as normal in some extent [7, 24] can also be increased. The implication of the pancreas or pancreatic enzymes in acute abdominal disease in the horse has not been well documented before. In a previous study, we have shown the presence of high plasma concentrations of active trypsin in horses suffering from strangulating intestinal obstruction and endotoxic shock [18].

However, on the basis of what is known about the complexed forms of human and bovine trypsin, we can conclude that the measurement of active trypsin does not account for all the forms of trypsin that may be present in the general circulation of horses. In biological fluids, trypsin exists under several forms, as inactive precursor (trypsinogen) and complexed forms with α_2 -macroglobulin (α_2 -M) and α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -PI) [8, 27, 34]. In physiological conditions the presence of free trypsin seems nearly impossible because of large amounts of plasmatic inhibitors [35]. The enzymatic assay of trypsin only measures free trypsin and trypsin

bound to α_2 -M because this binding does not inhibit the activity of the enzyme but hinders its access for large molecular weight substrates [36, 39]. The immunological assay, based on the recognition of trypsin by specific antibodies, permits the measurement of trypsinogen, free trypsin and trypsin bound to α_1 -PI. Trypsin bound to α_2 -M is not recognized by the antibodies because of steric inhibition [4]. The immunological method is thus complementary to the enzymatic assay and the application of the two methods may determine the whole quantities of trypsin in biological fluids. An immunological assay of equine trypsin has not yet been described, and we only found an abstract about its purification [19].

The aim of this study is to describe the purification of equine trypsin and the development of a radio-immunoassay technique (RIA) for equine trypsin measurement. The purification is based on the method applied for human trypsin [3, 43] and the RIA on the methods previously published for human trypsin [15, 28]. The RIA is applied to equine plasma for determination of plasma values in healthy horses in order to establish a reference range. Preliminary results in acute intestinal obstruction are also mentioned.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Reagents

The reagents used for the purification and the development of the radioimmunoassay technique (RIA) were from Merck Eurolab or Sigma-Aldrich, Belgium (analytical grade), unless other indication. Bovine albumin used for the preparation of buffers was RIA quality (Sigma). Polyethylene glycol 6000 was from Fluka. Radioactive iodine (^{125}I) was from ICN laboratories (Na^{125}I , carrier-free, alkaline solution). The gels Sephadex, ACA 44 and activated 4B Sepharose and the electrophoresis polyacrylamide gels (SDS-PAGE) were obtained from Pharmacia. Normal rabbit serum and the sheep antiserum against rabbit gammaglobulins were delivered by the Laboratory of Hormonology (Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgium). Animal housing and immunization were performed at the Laboratory of Hormonology (Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgium).

2.2. Protein measurement

The protein measurement was based on the registration of absorbance at 280 nm during the chromatographic steps of trypsin purification and by the spectrophotometric method of Folin Ciocalteu for the dialysed and concentrated extracts after the purification.

2.3. Measurement of trypsin activity

After each step of purification, the presence of trypsin was confirmed by the measurement of its enzymatic activity using a low molecular weight chromogenic substrate (BAPNA: N- α -benzoyl DL arginine para-nitroanilide). This technique is based on the proteolytic cleavage by trypsin of the chemical bond between arginine and para-nitroanilide, releasing para-nitroaniline, of which the absorbance was monitored at 405 nm (kinetic measurement, 15 min at 25°C) [25, 41].

The chromogenic substrate was used at the concentration of 2.3×10^{-3} M in 0.1 M Tris-HCl buffer, 0.02 M CaCl₂, at pH 8.2. To quantify the active trypsin present in the sample, the absorbance value was reported on a standard curve obtained in the same conditions with increasing amounts (from 0.5 to 10 μ g/mL) of active bovine trypsin (Sigma). The measurements were done with a spectrophotometer Perkin Elmer lambda 5 or on microplates with the Multiscan Ascent reader (Thermolab Systems).

In our working conditions, we did not observe interference with other pancreatic enzymes like chymotrypsin, elastase, kallikrein, collagenase, lipase, amylase and carboxypeptidase [18].

2.4. Purification of equine trypsin

2.4.1. Tissue extraction, (NH₄)₂SO₄ precipitation and dialysis

We followed the method previously described for the purification of human trypsin [3, 43]. The pancreas was extracted from horses euthanased for severe limb affections and stored frozen (-70°C). It was defrosted, cut and crushed at + 4°C in 4 volumes of H₂SO₄ 0.25 N, 0.1 % Tween 20 (pH \geq 2.5). The precipitate obtained after centrifugation (30 minutes at 1,500 g) was reextracted two times in H₂SO₄ 0.25 N, 0.1 % Tween 20. The three supernatants were pooled and centrifuged at 20,000 g (+ 4°C during 30 minutes) in order to eliminate nucleus and mitochondria. The supernatant was treated with ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ at 20 % saturation and then centrifuged 30 min at 10,000 g (+ 4°C). The supernatant was again treated

with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 80 % saturation, and then centrifuged in the same conditions. The final precipitate was dialysed in $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$ and concentrated.

2.4.2. Chromatographic steps and electrophoresis

After dialysis and concentration, the proteins were dissolved in a minimal volume of elution buffer, loaded on a gel filtration column (Sephadex G75) and eluted with 10^{-3} M HCl , 0.02 M CaCl_2 , 0.2 M NaCl , pH 3.0. The measurement of the trypsin activity was done on an aliquot volume of each eluted fraction, in the presence of 0.1 % enterokinase in order to activate the trypsinogen. The most active fractions were pooled, dialysed, concentrated, and then activated by 1 % enterokinase in order to liberate the trypsin from the trypsinogen. This activation was followed by a last step of affinity chromatography on 4B Sepharose linked to aprotinin in accordance to the method previously described [28]. The affinity column is eluted firstly with 0.1 M TRIS-HCl buffer ($\text{NaCl } 0.5 \text{ M}$, pH 8.0) to eliminate unbound proteins, secondly with 0.1 M Na-acetate buffer ($\text{NaCl } 0.5 \text{ M}$, pH 4.5) to eliminate elastase, and then with $0.1 \text{ M TRIS-glycine}$ buffer ($\text{CaCl}_2 \text{ } 0.05 \text{ M}$, pH 2.5) that allowed to detach trypsin bound to the aprotinin molecule linked to the sepharose column. After concentration and dialysis, the activity of the enzyme and the protein concentration were measured, and the purity of the enzyme was estimated by acrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE).

2.5. Development of the radio-immunoassay

2.5.1. Immunization

The purified equine trypsin was used to obtain an antiserum in the rabbit [6]. A first intradermic injection of $100 \mu\text{g}$ equine trypsin (in 0.05 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl , pH 7.4) emulsified with 1 mL of complete Freund's adjuvant was followed by booster injections of $50 \mu\text{g}$ of emulsified trypsin in 0.5 mL of incomplete Freund's adjuvant every 15 days. Blood samples were collected 12 days after each booster injection and the serum was analysed for its immunological reaction with equine trypsin by radial immunodiffusion and by binding to equine ^{125}I -labelled trypsin (labelled antigen). The titer of the antiserum was estimated by binding of a fixed amount of labelled antigen to a fixed volume of successive dilutions of the antiserum. The titer of the final blood sampling (rabbit exsanguination under anaesthesia) was defined as the highest antiserum dilution still binding 30 % of labelled antigen.

2.5.2. ¹²⁵I labelling

The radioactive labelling of equine trypsin was achieved by chemical binding of ¹²⁵I in the presence of chloramine T [17]. Trypsin (5 µg) dissolved in 5 µL of phosphate buffer (0.5 M Na₂HPO₄ and KH₂PO₄ at pH 7.4) was put into contact with 10 µL ¹²⁵I (± 1 mCi; Na¹²⁵I, carrier-free, in alkaline solution,) and 10 µL of a chloramine T solution (2 mg/mL in phosphate buffer 0.05 M). The reaction was stopped after 30 seconds by the addition of 10 µL of a sodium metabisulfite solution (Na₂S₂O₅; 2mg/mL in phosphate buffer 0.05 M) and by dilution with 300 µL of 0.05 M phosphate buffer. The reagents were applied on a gel filtration column (Sephadex G-25) and eluted with 0.05 M phosphate buffer containing 0.5 g of NaN₃ and 5 g of bovine serum albumin per litre. This chromatography was realized in order to eliminate unbound ¹²⁵I. The most radioactive fractions (1 mL) (counted with a γ counter RIASTAR-Canberra-Packard) were put together and passed on a gel filtration (ACA 44) column and eluted with the same phosphate buffer (0.05 M) in order to eliminate the degraded forms of the enzyme. The fractions with the highest radioactivity were pooled and diluted until obtaining a labelled antigen with a radioactivity of 35 000 to 40 000 cpm/100 µL.

2.5.3. RIA procedure

The RIA assay was based on the binding of trypsin to the antibody (formation of antigen-antibody complexes) followed by immunoprecipitation of the antigen-antibody complexes in the presence of anti-rabbit-gammaglobulins (obtained in the sheep) and by radioactivity counting in the precipitate. The measurement of trypsin in an unknown sample was based on the inhibition of the radioactive enzyme binding to the antibody by the unlabelled enzyme (competition between the labelled enzyme and the non-labelled enzyme for a same quantity of antibody, resulting in a decrease of the radioactivity measured in the precipitated antibody-trypsin complexes). The values of trypsin in the unknown samples were calculated with a reference curve obtained with increasing amounts of unlabelled trypsin.

The RIA reagents (labelled antigen, unlabelled trypsin, antiserum) were diluted in 0.05 M phosphate buffer containing 0.5 g of NaN₃ and 5 g of bovine serum albumine per litre (= incubation buffer). Briefly, 100 µL of the ¹²⁵I-trypsin solution (labelled antigen) were incubated in the presence of 100 µL of diluted antiserum (1/6,000 dilution) and 100 µL of a reference solution of unlabelled trypsin (from 1.25 to 250 ng/mL) or 100 µL of an unknown sample. The total radioactivity (TA) of the labelled antigen ranged from 30,000 to 40,000 counts per minute

for 100 μ L. The maximal binding of the labelled antigen to the antibody (B_0) was obtained in the absence of unlabelled trypsin. The non-specific binding (NSB) was obtained by incubation of the labelled antigen in the absence of the antibody. After incubation (various incubation times and temperatures were tested), the antigen-antibody complexes were immunoprecipitated by the addition of 100 μ L of incubation buffer added with 0.1 % of normal rabbit serum, followed by 1 mL of the precipitation solution (incubation buffer added with 60 g/L polyethylene glycol 6000, 200 mg/L of microcrystalline cellulose, 5 mL/L of Tween 20 and 0.5 % sheep anti-rabbit gammaglobulin serum). After 20 minutes of incubation at room temperature, the tubes were centrifuged (2000 g for 20 minutes), the supernatants were discarded and the tubes were counted. The results were expressed as the ratio (B/B_0 , expressed in %) between the amount of labelled antigen bound to antibody in the presence (B) and in the absence (B_0) of unlabelled trypsin. The ratios B/B_0 calculated for the unknown samples were reported on the standard curve to obtain the trypsin value in ng/mL.

The optimal conditions of RIA were achieved when the duration and the temperature of incubation as well as the final dilution of the antiserum permitted a 40 % value for B_0 (binding of 40 % of TA in the absence of unlabelled antigen), a non-specific binding not exceeding 5 %.

2.6. Characteristics of the RIA and application to equine plasma samples

2.6.1. Specificity, sensibility, precision, reproductibility and accuracy

The cross-reactivity of the antiserum was tested with equine albumin and the total protein contents of blood cells (isolated leucocytes or erythrocytes used after homogenization). The sensitivity was defined as the minimum amount of unlabelled trypsin that caused a reduction in the percent of labelled antigen bound to the antibody, greater than twice the standard deviation of 10 determinations of B_0 . The precision was estimated by the coefficient of variation calculated for 10 determinations of each standard trypsin concentration. The accuracy was estimated by the recovery of known amounts of trypsin added to equine plasma samples. The reproducibility was measured by the coefficient of variation calculated for at least five determinations of the same sample within or between assays.

2.6.2. Normal and pathological values

We established a reference range for immunological trypsin values in plasma of healthy horses ($n = 20$), and applied the RIA to horses suffering from acute intestinal obstruction ($n = 10$).

Plasma immunoreactive trypsin (IRT) was assayed on admission (P1) as well as during the surgery (P2) and the intensive care period about 24 hours after the end of surgery (P3). Another plasma sample (P4) was obtained when severe complications occurred or when the horse completely recovered a normal intestinal function (3-4 days after the surgery) except for the horses n° 7 and 10, which died early after the surgery.

3. RESULTS

3.1. Purification of the enzyme

The equine pancreatic tissue (122 g) furnished 7284 mg of proteins after the first extraction and, finally, we obtained 18.36 mg of trypsin (corresponding to an extraction rate of 0.25 %). After the gel filtration chromatography, about 50 % of pancreatic proteins were eliminated (Figure 1). The affinity chromatography then permits to eliminate all the remaining pancreatic proteins with a molecular weight close to that of trypsin (Figure 2) and to obtain a pure enzyme (96 % purity as estimated by densitometry realised on gel electrophoresis after staining). The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed a major band with a molecular weight of 24,000 Da and a minor band with a molecular weight slightly higher (traces of trypsinogen). Weak bands of about 12,000 Da were also present, that could be due to trypsin degradation fragments.

Fig. 1

Absorbency of proteins at 280 nm and enzymatic activity of trypsin at 405 nm.

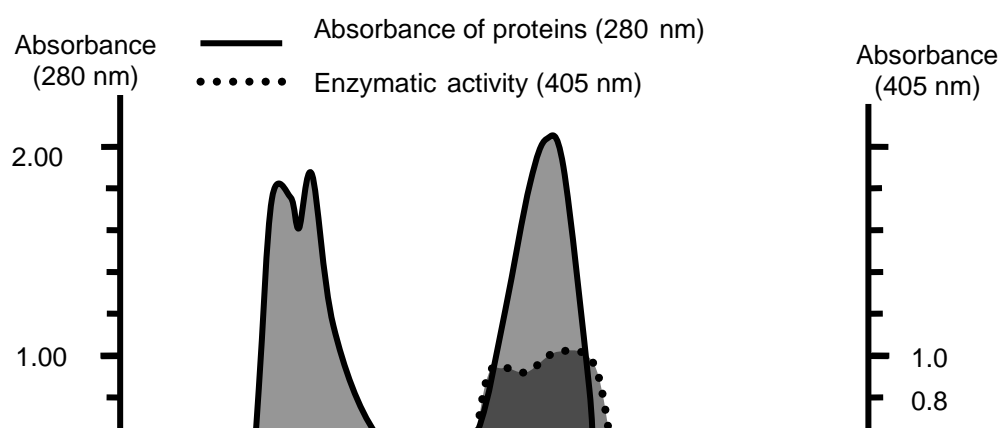
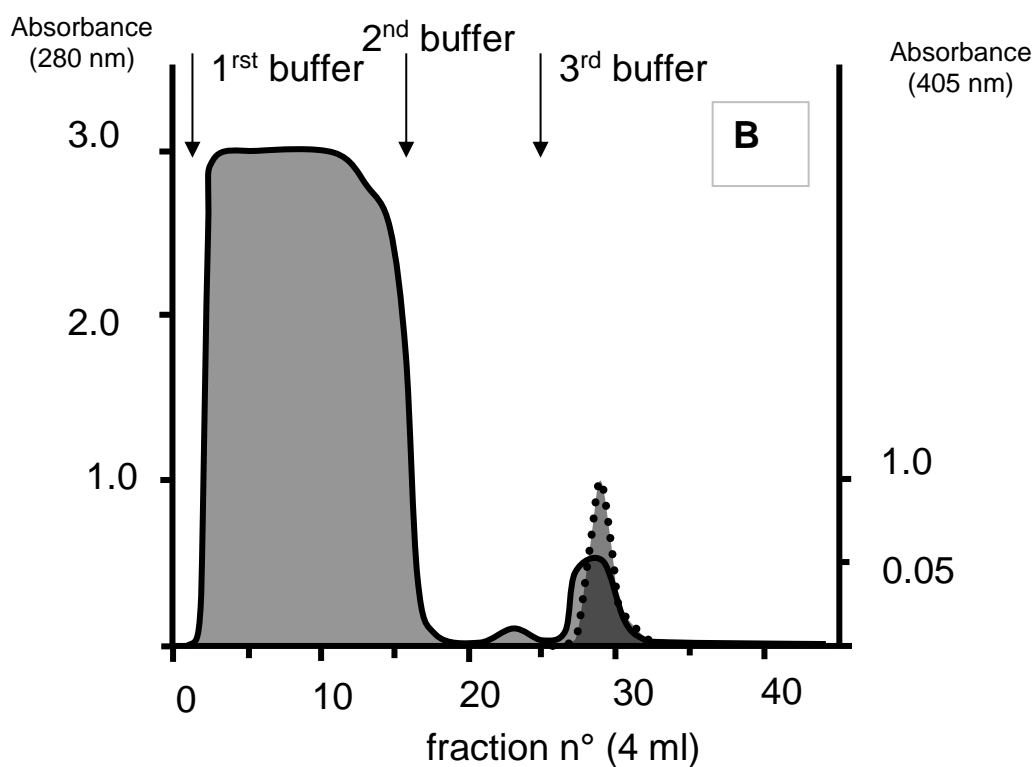


Fig. 2

Elution profile of trypsin after affinity chromatography and detection of enzymatic activity of trypsin at 405 nm.

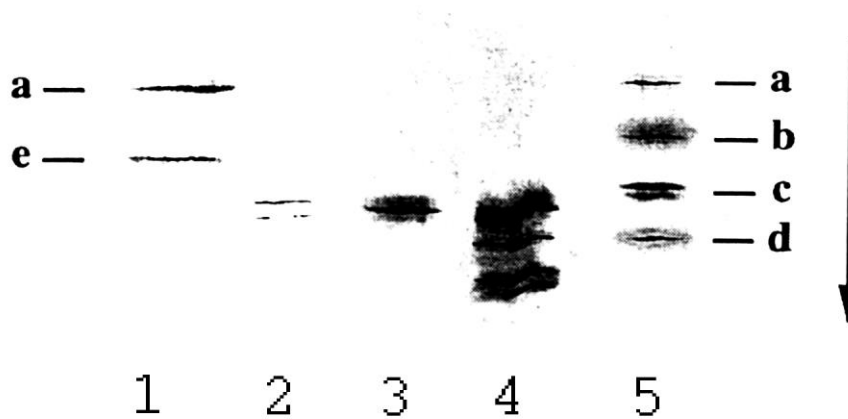


The electrophoresis of the enzyme after reducing treatment did not show any additional band demonstrating that the enzyme was monomeric (Figure 3). The specific activity (trypsin activity expressed by weight unit) was 4U/mg. When storing, even at -70°C , the degradation of the enzyme was fast and resulted in the formation of two major fragments (molecular weight of 15000 and 12000 Da) that still conserved an enzymatic activity. The enzymatic activity depended on Ca^{2+} , was maximal at pH 8.0, and was inhibited by aprotinin, soybean trypsin

inhibitor, azide and benzamidine. The inhibitions that we observed were similar to the human and bovine enzyme. Equine trypsin activity on low molecular weight substrates was also inhibited by albumin and equine plasma.

Fig. 3

Analysis of purified equine trypsin by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1 and 5: Molecular mass markers (a: bovine albumin, 67 kDa; b: ovalbumin, 43 kDa; c: carbonic anhydrase, 30 kDa; d: soybean trypsin inhibitor, 20 kDa; e: superoxide dismutase, 36 kDa). Lane 2: Bovine trypsin. Lane 3: Equine trypsin after affinity chromatography. Lane 4: equine trypsin and degradation products after storage.



3.2. Labelling and immunization

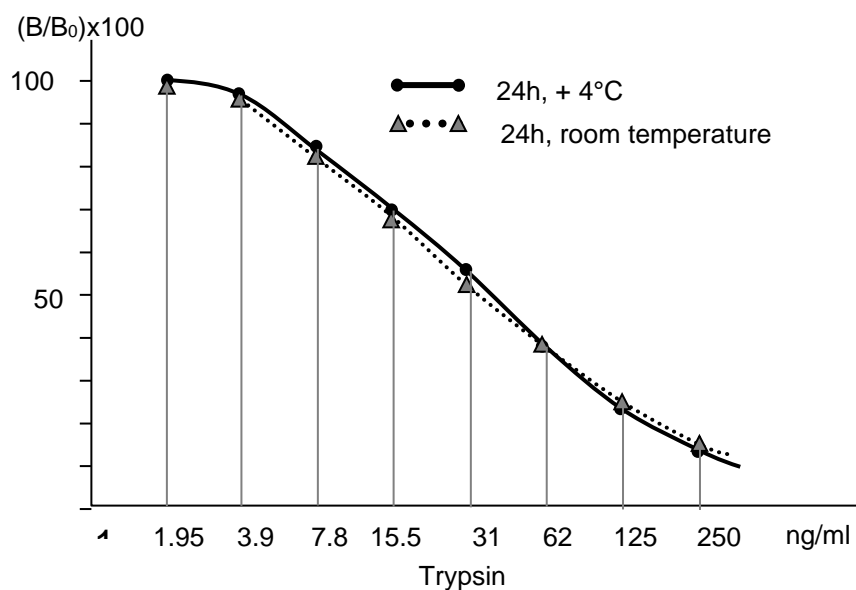
From two rabbits, we obtained two antisera that were used at an initial dilution of 1/6,000. At this dilution, the binding of labelled trypsin (40,000 cpm/100 μ L) to the antibody achieved its maximal value ($B_0 = 40\%$) after 4 hours of incubation and remained stable until 36 hours of incubation. There was no significant difference between the incubation time of 4 and 24h or between a temperature of 4°C and room temperature (18-20°C). The values of non-specific binding always remained between 2 and 4%. The chloramine T technique of labelling followed by gel filtration chromatography yielded a useful labelled antigen. The second step of gel chromatography (ACA 44) yielded a labelled trypsin free from degraded enzyme and from free iodine. The tracer was used at a dilution of 40,000 cpm/100 μ L and remained stable and immunoreactive for 40 days after labelling.

3.3. RIA conditions

The RIA conditions were the following: total activity adjusted to 40,000 cpm for 100 μ l of labelled antigen solution, antiserum at a dilution of 1/6,000 with an incubation time of 16-18 hours (overnight), that represented the easiest conditions for the laboratory. Figure 4 shows that the lower detection limit of the RIA was 4 ng trypsin/mL and the upper limit 200 ng/mL, and that the reference curve obtained at room temperature superimposed with the curve obtained at 4°C (Figure 4).

Fig. 4

Standard curves of RIA for equine trypsin obtained with incubation of 24 hours at + 4°C or at room temperature allowing detection of trypsin concentrations from 4 to 200 ng/mL.



From these results, we choose an overnight incubation at + 4°C for easy working conditions of our subsequent assays. The coefficient of variation calculated from 10 determinations of each point of the reference curve was always lower than 4 % for unlabelled trypsin concentrations ranging from 10 to 150 ng/mL, indicating an excellent reproducibility. The coefficient of variation intra- and interassay (n = 10) for unknown plasma samples never exceeded 6 % for samples measured in the linear part of the curve. The recovery of known amounts (from 10 to 100 ng/mL) of unlabelled trypsin added to plasma samples was always ≥ 90 %, indicating that a good accuracy. There was no cross-reaction with albumin or the intracellular content of equine leucocytes or erythrocytes.

3.4. Application to plasma samples and establishment of a reference range

The values measured in the plasma of healthy horses (n = 20) were represented on figure 5 with a mean value of 30.01 ± 6.84 ng/mL. The mean value + 3 SD (50.52 ng/mL) was chosen for the upper confidence limit with a probability of error $p < 0.01$.

3.5. Preliminary results in acute intestinal obstruction

Three horses showed non-strangulating lesions without post-operative complications. Their IRT values remained within the normal limits (table I and figure 5). Seven horses were presented with strangulating small or large intestine obstruction. Five of them did show increase in IRT values above normal physiological values. Especially two horses with severe intestinal lesions that did not survive had very high levels in each plasma sample (table I and figure 5).

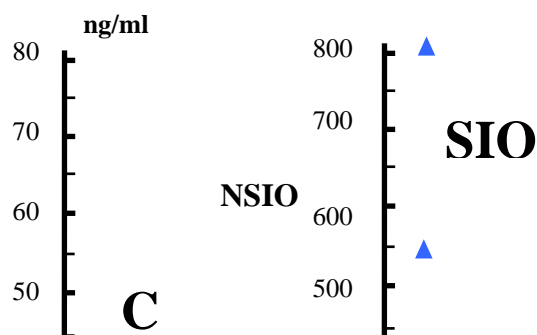
Table I

Immunoreactive trypsin values (IRT) in 10 horses with intestinal obstruction. Horses 1-3 had non strangulating obstruction, horses 4-10 had strangulation obstruction. The type of obstruction and the issue are also mentioned (S: survivor; NS: non-survivor).

Horse N°	Type of obstruction	Final issue	IRT (ng/mL)			
			P1	P2	P3	P4
1	Impaction of ileum	S	17	28	13	7
2	Large colon displacement	S	13	14	10	11
3	Large colon displacement	S	31	38	32	26
4	Ileal incarceration in epiploic foramen	S	19	50	19	96
5	Ileal incarceration in epiploic foramen	S	17	14	17	7
6	Large colon torsion	S	29	71	22	19
7	Large colon torsion	S	230	98	34	20
8	Jejunal incarceration in epiploic foramen	NS	31	20	7	10
9	Volvulus of jejunum	NS	800	180	178	-
10	Large colon torsion	NS	500	546	210	-

Fig. 5

Reference values of trypsin in healthy horses (C •) (n = 20) and trypsin levels in 3 horses with non strangulating intestinal obstruction (NSIO ♣) and 7 horses with strangulation obstruction (SIO ▲).



4. DISCUSSION

4.1. Purification of equine trypsin

Except a short abstract reporting the purification of equine trypsin and mentioning a molecular weight of 25,000 Da [19], the purification of equine trypsin has never been described extensively, in contrast to the enzyme of human, bovine and other species (cat, dog, rat). Therefore, we followed the methods reported for the purification of human trypsin [3, 43], an enzyme that has already been purified several times in our laboratory [23]. The purification technique started with a tissue grinding in acid milieu, followed by two steps of precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ that eliminated most of the contaminating proteins of high molecular weight (elimination of 84 % of the total protein content). The gel filtration chromatography (G-75) eliminated still 10 % of total protein concentration (especially contamination of molecular weight superior to 80,000 Da). At this step of purification, the trypsin activity was detected (after activation by enterokinase) in the second peak, showing that the enzyme was present under the enzymatically inactive precursor form (trypsinogen). We detected a trypsin activity in the first peak that corresponded essentially to complexes of active trypsin bound to intrapancreatic inhibitors, but this activity did not exceed 20 % of the activity detected in the second peak. The working in acid milieu permitted to limit the autoactivation of trypsinogen and to avoid the addition of enzymatic inhibitors during the purification. The last step of

chromatography (affinity chromatography) had a low efficiency (0.13 %) but yielded an active and pure enzyme (purity of ≥ 96 %) that was not contaminated by elastase or chymotrypsin (their enzymatic activity was not detectable by using specific low molecular weight substrates). A large amount of trypsinogen that has not been activated, eluted with the first buffer (pH 8.0) explaining the low efficiency of the affinity chromatography step.

The global scheme of purification was similar to that used for the human enzyme [3, 28, 43], with a lower efficiency due to incomplete activation of trypsinogen into trypsin by enterokinase. The molecular weight of the equine enzyme (24,000 Da) was similar to the human trypsin but the equine enzyme seemed to be more fragile as shown by the presence of small bands of degradation observed by electrophoresis ($MW \pm 14000$ Da), and by the rapid increase of degradation when the enzyme was stored frozen, even at -70°C . The equine trypsin reacted similarly like human or bovine trypsin with classic inhibitors of serine proteases [8, 9, 35]. We did not test the inhibition of trypsin with α_2 -M or α_1 -PI because we did not have these equine antiproteases in our laboratory and could not buy them.

4.2. Establishment of the RIA

We applied the classical ^{125}I labelling technique with chloramine T, as previously used for many proteins [17] and for human trypsin [28] and obtained a labelled antigen that was stable for 40 days. We obtained two antisera that were used at a dilution of 1/6,000 (yielding 40 % of binding of the labelled antigen). As the equilibrium of the antibody-antigen reaction was reached after 4 hours of incubation at $+4^{\circ}\text{C}$ or room temperature, and did not vary until 36 hours of incubation, the conditions of the assay, 16-18 hours of incubation at $+4^{\circ}\text{C}$, were chosen to facilitate the work: overnight incubation allowed an easy planning of the assays, and $+4^{\circ}\text{C}$ provided a fixed temperature independent of laboratory temperature variations.

The reference curve showed a good sensitivity of the RIA with a detection threshold of 4 ng/mL and a superior limit of 200 ng/mL, comparable to the reference curves and the sensibility limits (from 0.6 to 10 ng/ml) previously established for the RIA of human and other species tryptins [1, 10, 15, 28, 40, 42, 46]. The intra- and interassay variation coefficients were low, never exceeding 6 % for trypsin values in the linear part of the reference curve, indicating that the RIA was precise and reproducible. The assay was specific because the antibodies did not recognize albumin or the global content of equine leukocytes or erythrocytes. There was no

cross-reaction with human or bovine trypsin. The accuracy of the assay was very good, because 90 % of the added amounts of trypsin were detected by the assay.

4.3. Estimation of normal and pathological values

The mean value of immunoreactive trypsin (IRT) in the horse (30.01 ± 6.84 ng/mL) was similar to the mean value observed in humans ($26-30 \pm 12$ ng/mL) [1, 5, 10, 15, 22, 28] and other species [13, 40, 46]. The superior limit of normal values was 50 ng/mL (corresponding to the mean value + 3 SD, $p < 0.01$). The comparison with other normal values in the horse was not possible because the assay has not yet been described. Nevertheless, the value was similar to the human maximal physiological value of 70 ng/mL [5]. The sampling conditions (immediate versus delayed centrifugation) and the type of anticoagulant used did not seem to influence the results of IRT in the horse. This was similar to what we observed in humans but should be examined on a larger number of horses. Within the horses suffering from intestinal obstruction, only those cases with strangulation obstruction have shown high IRT concentrations and the increase was observed in horses suffering from small as well as large intestine obstruction. In a previous study [18] we already showed an increase in plasma trypsin activity in horses suffering from intestinal obstruction and shock and the assay of immunoreactive trypsin is complementary to the assay of trypsin activity. Further studies using the two assay methods should be done in order to evaluate the degree of pancreatic implication in equine acute abdominal disease.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Funds for Scientific and Medical Research (FRSM) – Belgium (Grants n° 3.4615.98).

6. REFERENCES

- [1] Borgtröm A., Ohlsson K., Radioimmunological determination and characterization of cathodal trypsin-like immunoreactivity in normal human plasma, *Scand. J. Clin. Lab. Med.* 36 (1976) 809-814.

- [2] Borzotta A.P., Polk H.C., Multiple system organ failure, *Surg. Clin. North Am.* 63 (1983) 315-336.
- [3] Brodrick J.W., Largman C., Johnson J.H., Geokas M.C., Human cationic trypsinogen, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 2732-2736.
- [4] Brodrick J.W., Geokas M.C., Largman C., Fassett M., Johnson J.H., Molecular forms of immunoreactive pancreatic cationic trypsin in pancreatitis patient sera, *Am. J. Physiol.* 237 (1979) E474-E480.
- [5] Deby-Dupont G., Haas M., Pincemail J., Braun M., Lamy M., Deby C., Franchimont P., Immunoreactive trypsin in adult respiratory distress syndrome, *Intensive Care Med.* 10 (1984) 7-12.
- [6] Deby-Dupont G., Grulke S., Caudron I., Mathy-Hartert M., Benbarek H., Deby C., Lamy M., Serteayn D., Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radio-immunoassay and first results in septic pathologies, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66 (1998) 257-271.
- [7] Diamond J.M., Reabsorption of digestive enzymes: playing with poison, *Nature* 271 (1978) 111-112.
- [8] Feeney R.E., Means G.E., Bigler J.C., Inhibition of human trypsin, plasmin and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 1957-1960.
- [9] Figarella C., Negri G.A., Guy O., The two human trypsinogens. Inhibition spectra of the two human trypsinogens derived from their purified zymogens, *Eur. J. Biochem.* 53 (1975) 457-463.
- [10] Florholmen J., Jorde R., Olsen R.L., Kolmannskog S., Burhol P.G., Radioimmunoassay of cationic trypsin-like immunoreactivity in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 19 (1984) 613-621.
- [11] Florholmen J., Revhaug A., Burhol P.G., Giercksky K.E., Olsen R., Effect of intravenous and intraduodenal administration of Escherichia coli endotoxin on the porcine pancreas as evaluated by changes in the serum cationic trypsin-like immunoreactivity. *Scand. J. Gastroenterol.* 20 (1985) 279-284.
- [12] Florholmen J., Revhaug A., Burhol P.G., Lundgren T.I., Giercksky K.E., Effect of hemorrhagic and nortriptyline-induced shock on the porcine pancreas as evaluated by changes in serum cationic trypsin-like immunoreactivity, *Scand. J. Gastroenterol.* 20 (1985) 720-726.

- [13] Florhomen J., Riepl R., Almdahl S.M., Myklebust R., Burhol P.G., Giercksky K.E., Malm D., Impact of experimental endogenous gram-negative peritonitis on the pancreas of the rat as evaluated by cationic trypsin-like immunoreactivity in peritoneal fluid and serum and by electron microscopy of pancreatic tissue. *Scand. J. Gastroenterol.* 22 (1987) 313-320.
- [14] Florholmen J., Lindal S., Rokke O., Olsen R., Burhol P.G., Revhaug A., Effects of endotoxin on the pancreatic ultrastructure, *APMIS* 96 (1988) 991-996.
- [15] Geokas M.C., Largman C., Brodrick J.W., Johnson J.H., Determination of human pancreatic cationic trypsinogen in serum by radioimmunoassay, *Am. J. Physiol.* 236 (1979) E77-E83.
- [16] Gmaz-Nikulin E., Nikulin A., Plamenac P., Hegewald G., Gaon D., Pancreatic lesions in shock and their significance, *J. Pathol.* 135 (1981) 223-236.

- [17] Greenwood F.C., Hunter W., Glover J., The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone in high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89 (1963) 114-123.
- [18] Grulke S., Gangl M., Deby-Dupont G., Caudron I., Deby C., Serteyn D., Plasma trypsin level in horses suffering from acute intestinal obstruction, *Vet. J.* in press.
- [19] Harris C.I., Hofman T., Studies on equine trypsinogen and trypsin. *Biochem. J.* 114 (1969) 82.
- [20] Hegewald G., Nikulin A., Gmaz-Nikulin E., Plamenac P., Bärenwald G., Ultrastructural changes of the human pancreas in acute shock, *Pathol. Res. Pract.* 179 (1985) 610-615.
- [21] Hildebrand L.B., Krejci V., Banic A., Erni D., Wheatley A.M., Sigurdsson G.H., Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock, *Crit. Care Med.* 28 (2000) 3233-3241.
- [22] Iwaki K., Ogawa M, Kitahara T., Tanaka S., Kosaki G., Influence of inactivation of trypsin on immunoreactivity and serum immunoreactive trypsin concentration measured by radioimmunoassay. *Enzyme* 29 (1983) 153-159.
- [23] Lamy M., Faymonville M.E., Deby-Dupont G., Shock pancreas: a new entity? in: Vincent J.L. (Ed.), *Update in Intensive Care and Emergency Medicine*, Springer, Berlin, 1987, pp. 148-154.
- [24] Liebow C., Rothman S.S., Enteropancreatic circulation of digestive enzymes, *Science* 189 (1975) 472-474.
- [25] Lottenberg R., Hall J.A., Blinder M., Binder E.P., Jackson C.M., The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions, *Biochim. Biophys. Acta* 742 (1983) 539-557.
- [26] Lucas C.E., Ledgerwood A.M., The fluid problem in the critically ill, *Surg. Clin. North Am.* 63 (1983) 439-454.
- [27] Mallory P.A., Travis J., Human pancreatic enzymes. Characterization of anionic human trypsin. *Biochemistry* 12 (1973) 2847-2851.
- [28] Malvano R., Marchisio M., Massaglia A., Giacosa P.A., Zannino M., Andriulli A., Burlina A., Radioimmunoassay of trypsin-like substance in human serum, *Scand. J. Gastroenterol.* 15 Suppl 62 (1980) 2-10.
- [29] Meyer W.J., Ducker T.B., Central nervous system function in critical care, *Surg. Clin. North Am.* 63 (1983) 401-416.
- [30] Mitsuoka H., Kistler E.B., Schmid-Schonbein G.W., Generation of in vivo activating factors in the ischemic intestine by pancreatic enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 1772-1777.
- [31] Moore J.N., White N.A., Berg J.N., Trim C.M., Garner H.E., Endotoxemia following experimental intestinal strangulation obstruction in ponies, *Can. J. Comp. Med.* 45 (1981) 330-332.
- [32] Morris D.D., Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis, *J. Vet. Int. Med.* 5 (1991) 167-181.
- [33] Nicod L., Leuenberger C., Seydoux C., Rey F., Van Melle G., Perret C.L., Evidence for pancreatic injury in adult respiratory distress syndrome, *Am. Rev. Respir. Dis.* 131 (1985) 696-699.
- [34] Ohlsson K, Skude G., Demonstration and semiquantitative determination of complexes between various proteases and human α_2 -macroglobulin. *Clin. Chem. Acta* 66 (1976) 1-7.
- [35] Rinderknecht H., Pancreatic secretory enzymes, in: Vay Liang W. Go, Dimagno E.P., Gardner J.D., Lebenthal E., Reber H.A., Scheele G.A. (Eds.), *The Pancreas*

- Biology, Pathobiology and Disease, Raven Press, Ltd., New York, 1993, pp. 219-251.
- [36] Rinderknecht H., Fleming R.M., Geokas M.C., Effect of α_2 -macroglobulin on some kinetic parameters of trypsin, *Biochim. Biophys. Acta* 377 (1975) 158-165.
 - [37] Siegel J.H., Cardiorespiratory manifestations of metabolic failure in sepsis and the multiple organ failure syndrome, *Surg. Clin. North Am.* 63 (1983) 379-399.
 - [38] Snyder J.R., The pathophysiology of intestinal damage: effects of luminal distention and ischemia, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 5 (1989) 247-270.
 - [39] Starkey P.M., Barrett A.J., Evolution of alpha 2-macroglobulin. The demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human alpha 2-macroglobulin, *Biochem. J.* 205 (1982) 91-95.
 - [40] Steiner J.M., Medinger T.L., Williams D.A., Development and validation of a radioimmunoassay for feline trypsin-like immunoreactivity. *Am. J. Vet. Res.* 57 (1996) 1417-1420.
 - [41] Svendsen L., Blomback B., Blomback M., Olsson P.I., Substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes, *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.* 98 (1972) 446-454.
 - [42] Temler R.S., Felber J.P., Radioimmunoassay of human plasma trypsin, *Biochim. Biophys. Acta* 445 (1976) 720-728.
 - [43] Travis J., Roberts R.C., Human trypsin. Isolation and physical-chemical characterization, *Biochemistry* 8 (1969) 2884-2889.
 - [44] Tribl B., Madl C., Mazal P.R., Schneider B., Spitzauer S., Vogelsang H., Gangl A., Exocrine pancreatic function in critically ill patients, *Crit. Care Med.* 28 (2000) 1393-1398.
 - [45] Warshaw A.L., O'Hara P.J., Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock, *Ann. Surg.* 188 (1978) 197-201.
 - [46] Williams D.A., Batt R.M., Sensitivity and specificity of radioimmunoassay of serum trypsin-like immunoreactivity for the diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192 (1988) 195-201.

**PANCREATIC INJURY IN EQUINE ACUTE ABDOMEN
EVALUATED BY PLASMA TRYPSIN ACTIVITY AND
HISTOPATHOLOGY OF PANCREATIC TISSUE**

S. GRULKE, G. DEBY-DUPONT, D. CASSART, M. GANGL, I. CAUDRON, M. LAMY,
AND D. SERTEYN

Anesthésiologie générale et Pathologie chirurgicale des grands animaux, Faculté de Médecine
Vétérinaire, Université de Liège (ULg), Belgium (SG, MG, IC, DS)

Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement, ULg, Belgium (GDD, ML, DS)

Pathologie générale, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg, Belgium (DC)

Anesthésie et Réanimation, Faculté de Médecine, ULg, Belgium (ML)

Soumis pour publication

Summary

In cases of equine acute abdomen, suspected pancreatic damage can be assessed by the measurement of increased trypsin activity in the plasma of horses suffering intestinal obstruction and severe shock. The pancreas could be particularly vulnerable to splanchnic hypoperfusion because it is a highly active tissue. In this study 10 horses undergoing abdominal surgery for intestinal obstruction were assayed for trypsin activity on admission and, because of extensive intestinal lesions not amenable to surgery, euthanasia was elected and pancreas was extracted before euthanasia. Trypsin activity in the plasma was significantly higher than in healthy horses ($196 \text{ ng/mL} \pm 128.2$ versus $28.5 \text{ ng/mL} \pm 19.2$; $p = 0.0026$). Optic and transmission electron microscopy revealed slight to severe lesions of vacuolar degeneration, a small number of zymogen granules, dilatation of endoplasmic reticulum, and swelling of mitochondria in the exocrine pancreas. The activation of inflammatory cascade occurring during strangulating intestinal obstruction could increase pancreatic anoxic lesions due to severe shock and hypoperfusion in the horse. Further studies should show the significance of pancreatic lesions and the ensuing damage in equine acute intestinal obstruction and shock.

Key words: acute abdomen; horse; pancreas; plasma trypsin activity; shock.

Introduction

In horses, acute pancreatic disease is a rarely studied entity, and pancreatic involvement in shock states consecutive to acute abdominal disorders has not yet been described. But pancreatic injury consecutive to hypovolemic or septic shock has been largely demonstrated in animal models by histological observations (acinar cell damage and necrosis) in pigs,⁶ monkeys,^{7,24,25} rabbits,¹⁶ and rats¹⁴ and by biochemical assays (increased pancreatic enzyme concentrations in blood).⁵ It was attributed to splanchnic hypoperfusion because of particular susceptibility of the pancreas to decreased blood flow. The perturbation of the pancreatic microvascular perfusion has been regarded as an important pathogenic factor of pancreatitis.¹⁶

In humans, it has been demonstrated that shock, especially septic and traumatic shock, leads to hypoperfusion of the splanchnic area, often resulting in multiple organ failure. Among the splanchnic organs, the pancreas seems to be particularly vulnerable to hypovolemia, a so-called "shock organ".³⁰ Histological studies demonstrated profound ultrastructural alterations of this organ (especially visible in the mitochondria and endoplasmic reticulum) after severe trauma with major blood loss not affecting directly the splanchnic area.^{13,15} Biochemical assays of increased blood concentrations of amylase, lipase, and trypsin show the pancreatic damage in various clinical situations such as cardiovascular surgery with extra-corporeal circulation, severe sepsis and septic shock as well as major trauma most often without clinical signs of pancreatitis.^{2,4,28,30} This unexpected pancreatic failure was related to hypoperfusion and/or neutrophil activation, and the particular vulnerability of the pancreas was attributed to the high metabolic activity of the acinar cells and to the specific structure of the blood distribution in this organ.³

In an earlier study, we demonstrated a high trypsin activity in the plasma of horses submitted to surgery for intestinal obstruction, especially in those with severe signs of endotoxic shock, and observed an increase of plasma trypsin activity in the post-operative period.¹¹ As abnormal trypsin activity was also found in the plasma of horses with non strangulating large intestine obstruction the increased plasma concentrations of trypsin could not solely be due to an increased reabsorption from the ischemic intestinal walls, and it was hypothesized that pancreatic lesions were present. The aim of this study was the biochemical analysis of plasma trypsin activity and the light and transmission electron microscopy study of the pancreatic tissues of horses presenting with severe and irreversible intestinal lesions not amenable to surgery and euthanized during anaesthesia after extraction of the pancreas.

Materials and methods

Case description

Ten horses admitted for acute abdominal disease and diagnosed with a pathology needing surgery were used in this study. Blood was drawn at arrival for the biochemical analysis and assay of enzymatically active trypsin (EAT). Clinical (heart rate, respiratory rate and systolic arterial pressure measured at the coccygeal artery by a Doppler), haematological and biochemical parameters (packed cell volume, blood lactate concentration [L-lactate analyser, Ankersmith], blood urea nitrogen [Vet Test, Iddexx]) were determined and used for the classification of the cardiovascular status, according to a scoring system as previously described (absent, mild or severe shock corresponding to shock score 1, 2 and 3).¹⁰ There were six warmbloods, two Lusitanians, one Welsh pony and one Arab. The mean age was of 10 years ranging from 5 to 24 years with six geldings, three mares and one stallion.

Three horses (two ponies and one warmblood, age from 2 to 9 years) euthanized for long bone fractures without acute abdominal disease or endotoxic shock were utilized as control.

EAT assay

All the horses had assay of EAT at admission. Plasma samples were immediately stored at – 20°C until assay. Briefly, the assay is based on the proteolytic cleavage of a specific low molecular weight substrate by active trypsin.^{18,27} This chromogenic substrate, carbobenzyloxyl-L-valyl-glycyl-L-arginine-p-nitranilide (Chromozym Try®, Boehringer, FRG), is cleaved by trypsin at the level of the arginine-nitranilide bond and releases paranitraniline. The production of this latter molecule is detected by spectrophotometry at 405 nm (25°C). One unit of trypsin activity is defined as the amount of trypsin that hydrolyzes one mole of substrate per min at 25°C. The EAT value of the sample was obtained from a standard curve performed with known amounts of active bovine trypsin, and expressed in ng/mL. This technique allows to measure out free trypsin and trypsin bound to α_2 macroglobulin.¹ Plasmatic proteases derived from the coagulation and fibrinolytic cascades as well as chymotrypsin, elastase, collagenase, cathepsins and the proteases of the complement cascade do not interfere.^{1,26}

The reproducibility was tested in our laboratory and the coefficient of variation inter-assay (8 assays of the same sample) for normal plasma samples (n = 10) was of 2.1 ± 1.5 %. For plasma samples with very high values (n = 12) it was of 4.4 ± 1.5 %. The accuracy of the test was good

because added amounts of 100 ng/mL of trypsin were recovered at $\geq 90\%$. The physiologic range of EAT in healthy horses ($n = 38$) was previously determined to be $28.5 \text{ ng/mL} \pm 19.2$ ranging from 3 to 78 ng/mL.¹¹ An unpaired t Test with Welch correction was used to compare the means of EAT between healthy horses and the pathological ones.

Histological examination of the pancreas

Before euthanasia, the pancreas was extracted under general anaesthesia for histo-pathological evaluation of the cases described above. For comparison the pancreas of three horses being euthanized for localised limb affections (long bone fracture) was extracted in the same way. Small fragments (1mm in diameter) were immediately immersed for fixation in 2.5 % glutaraldehyde in phosphate buffer (with postfixation in 1 % osmium tetroxide) for transmission electron microscopy. The samples were embedded in Epon. The ultra-thin sections were mounted on copper grids and stained with uranyl and lead and electron micrographs were taken by a transmission electron microscope Zeiss 910 80KV. Larger fragments (2 – 3 cm in diameter) were fixed in 10 % buffered formalin for at least 24 hours. The tissue fragments were then cut in 4 mm slides and embedded in paraffin wax for light microscopy. Sections of three millimetres were dehydrated for 24 hours at 37°C and then stained with hematoxylin and eosin.

Results

Case description

Small intestine strangulation obstruction was found in 5 cases, with absent ($n = 1$), mild ($n = 2$) or severe signs of shock ($n = 2$). In all the cases the small intestine was judged non viable (20 cm to 12 m). Euthanasia was elected because enterectomy was not permitted. The other 5 horses had large intestinal obstruction without shock symptoms ($n = 1$) or with mild shock ($n = 4$). Table 1 shows a more detailed description of the cases, their pathology and the corresponding intestinal lesion. Euthanasia was performed because the vascular lesions were too extensive; there were multiple obstructing adhesions or a non-reducible intussusception.

Plasma EAT activity

Horse number 1 showed plasma EAT near the maximal reference value. All the other horses had high trypsin activity. Statistical analysis showed a mean value of $196 \text{ ng/mL} \pm 128.2$

ranging from 80 to 500 ng/mL, which is significantly different from the mean control of healthy horses ($P = 0.0026$). Table 1 also shows the corresponding EAT value of each case as well as the EAT mean value of the healthy control.

Table I

Horses number (HN) 1 to 10, classified according to their shock score (SS), with the corresponding duration of colic before presentation to the clinic, the intestinal disorder observed in surgery and the type and degree of vascular compromise as well as the plasma trypsin activity (EAT in ng/mL) on admission. EAT values of healthy horses and of control were also mentioned.

HN	Colic duration (hours)	SS	Intestinal disorder	Lesion	EAT (admission)
1	chronic	1	SI LI adhesions	Multiple chronic adhesions between LI and SI	80
2	12	1	Strangulating lipoma	Necrosis of jejunum (3 m)	115
3	24	2	Caecal torsion	Necrosis of caecum	170
4	12	2	Asc. colon torsion	Edema, hemorrhagic mucosa	135
5	14	2	EF SI	Necrosis of ileum (2 m)	140
6	60	2	Non reducible cecocolic intussusception	Necrosis of caecum	160
7	8	2	SI volvulus	Necrosis of jejunum (10 m)	95
8	8	2	Asc. colon torsion	Edema, hemorrhagic mucosa	310
9	24	3	SI inguinal hernia	Necrosis of ileum (0.2 m)	500
10	16	3	EF SI	Necrosis of jejunum/ileum (12 m)	255
Healthy control horses (plasma EAT) (n = 38)					28.5 ± 19.2
Control horses (pancreas extraction) (n = 3)					5-36

SI : small intestine ; LI : large intestine ; Asc. colon : Ascending colon ; EF : incarceration in epiploic foramen

General histological observations

Histo-pathological evaluation showed that the general structure of the pancreas was visible in all the preparations (three control horses and 10 horses suffering from intestinal obstruction). The exocrine pancreas showed disseminated endocrine islets. The exocrine pancreatic tissue was composed of glandular epithelial cells of pyramidal form. The acinus organization was not readily visible. The nucleus was large and hyperchromatic in parabasal position. Electron transmission micrographs of pancreatic cells of the control horses had well-conserved ultrastructural features (rough endoplasmic reticulum, mitochondria, zymogen granules, nucleus).

Light microscopy

Horse number 1 had a well-conserved exocrine pancreatic tissue. The granulous cytoplasm contained only a small number of zymogen granules on the apical border (Fig. 1). Horse number 2 presented similar pancreatic aspect. The other horses and especially number 10 had white vacuoles of variable size in the cytoplasm (degeneration). Other cells were distended and presented more eosine staining cytoplasm (intracellular edema). Cell contours were less defined with a disorganized aspect. Horse number 10 also showed very pale nucleus (Fig. 2).

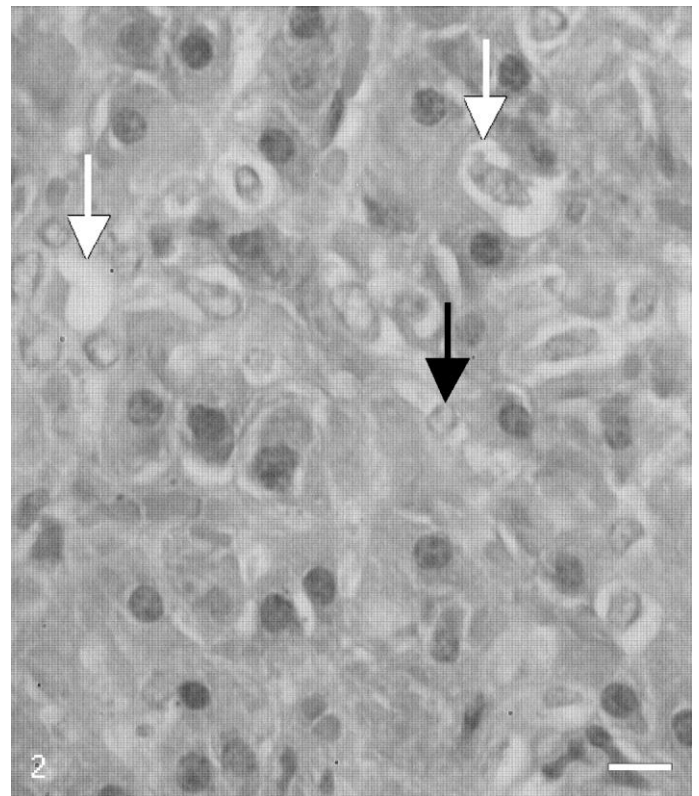
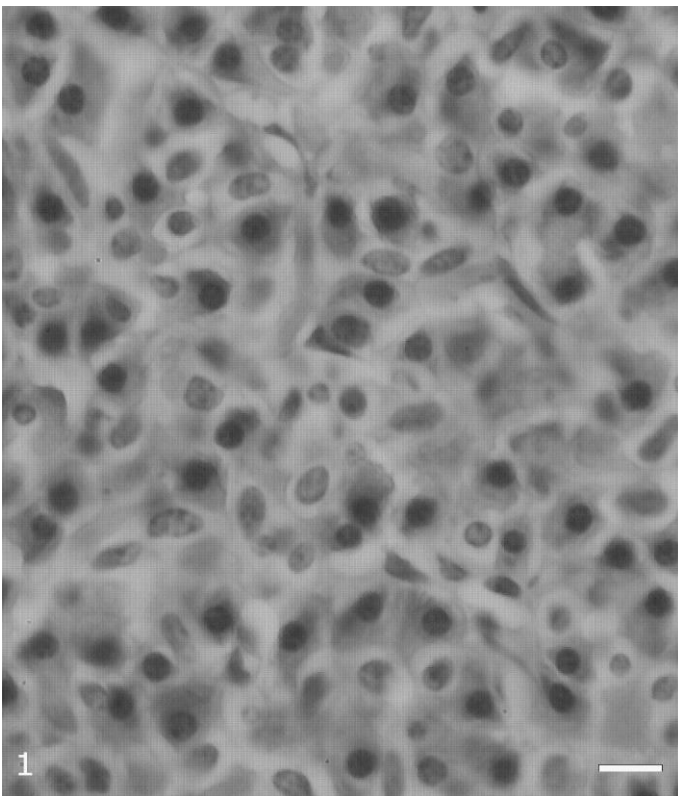


Fig. 1 Pancreas; horse; case number 1. Normal acinar cells with a small number of zymogen granules on the apical border. HE. Bar = 10 μ m.

Fig. 2 Pancreas; horse; case number 10. The acinar cells contain white vacuoles of variable size in the cytoplasm (white arrow). Several cells with very pale and less contrasted nucleus (black arrow). HE. Bar = 10 μ m.

Electron transmission microscopy

Ultrastructural features of pancreatic cells from horse number 1 were only slightly vacuolated. The rough endoplasmic reticulum (RER) was distributed throughout the cytoplasm with visible ribosomes well attached to the membrane. Mitochondria were intact. Few granules were seen at the apical pole of the acinar cells (Fig 3).

In striking contrast, RER from pancreatic cells of horses' number 3 to 10, with more severe shock, was vacuolated. Indeed, the RER of acinar cells was markedly dilated and filled with amorphous material. The ribosomes were still attached to the RER membrane and some mitochondria appeared intact. Few granules were still present (Fig. 4).

Several horses (especially horses number 9 and 10) also showed mitochondrial swelling and disruption of the inner mitochondrial membrane, but the mitochondrial damage was not observed in all the mitochondria of the cell. Dilated cisterns of RER were observed with detached free ribosomes and homogenous material in the cisterns. Autophagic vacuoles were also visible (Fig. 5).

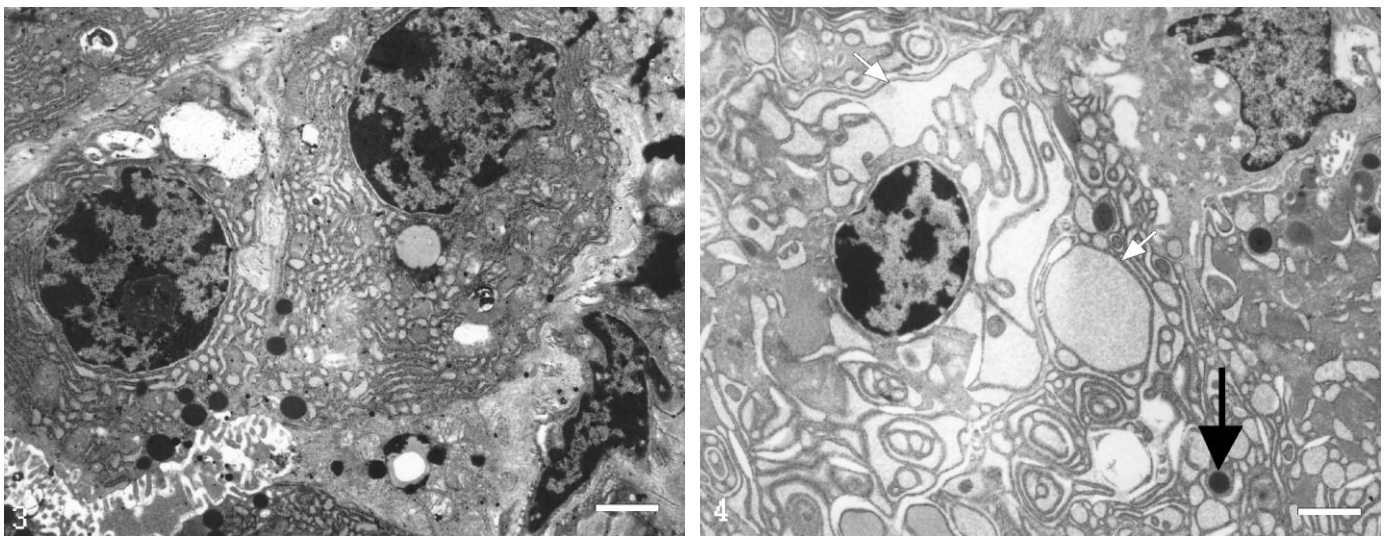


Fig. 3 Transmission electron micrograph. Pancreas; horse No. 1. Acinar cell of exocrine pancreas with normal rough endoplasmic reticulum (RER) distributed throughout the cytoplasm and normal mitochondria. Few zymogen granules are also observed. Bar = 1.5 μ m.

Fig. 4 Transmission electron micrograph. Pancreas; horse No. 10. Acinar cells of exocrine pancreas presenting vacuolated rough endoplasmic reticulum (white arrow) with still attached ribosomes but filled with amorphous material. Very few zymogen granules (black arrow) Bar = 1.5 μ m.

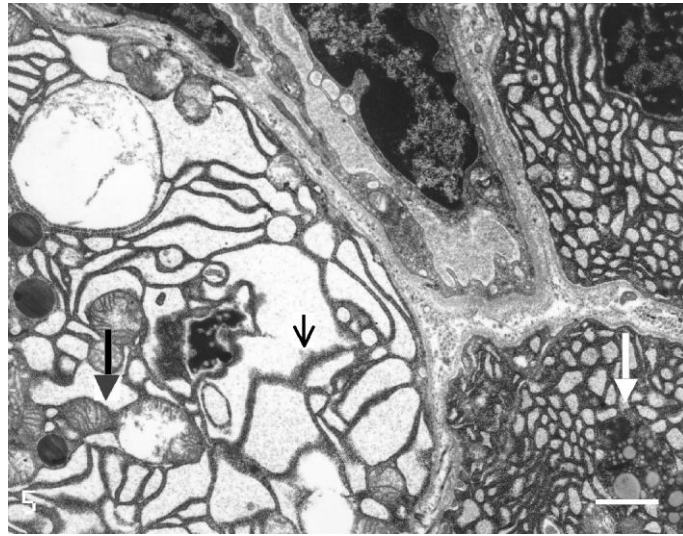


Fig. 5 Transmission electron micrograph. Pancreas; horse No. 9. Acinar cells and capillary. Extensively dilated cisterns of RER, detachment of ribosomes (open arrow). Swelling of some mitochondria with disruption of the inner membrane (black arrow). Autophagic vacuole (white arrow). Bar = 1 μ m.

Discussion

In horses, pancreatic disease is not well documented. One study established normal values for amylase and lipase in horse's blood and peritoneal fluid²² in order to develop diagnostic tools for pancreatic damage. The biochemical markers of pancreatic damage are routinely measured in pancreatic disease in humans, but in shock patients, measurements of plasma concentrations of pancreatic enzymes are not often performed. Nevertheless, as early as in the 1970's, hyperamylasemia was observed after extra-abdominal surgery in humans.^{19,28} Since these early observations, plasma increases of the pancreatic enzymes have been largely reported after invasive surgery and in critically ill patients, particularly when shock and/or sepsis were present.^{2,4,20,30} These pancreatic enzyme increases occurred most often without clinical signs of pancreatitis, and histological evaluation did not always show lesions especially by light microscopy.²⁹

We previously demonstrated pancreatic involvement in equine acute abdomen by biochemical measurements.¹¹ As in humans and other species amylase can originate from salivary glands and lipase can be released from liver, so that their increased concentrations in blood were not specific signs of pancreatic injury,³² the plasma trypsin activity was measured out in order to evaluate pancreatic damage. Trypsin is specific of pancreas and has a key function because it

activates the pancreatic enzyme cascade.²³ It activates its own zymogen and those of all the other pancreatic enzymes. In this study increased blood concentrations of trypsin were found and it was demonstrated that this biochemical marker of pancreatic damage was accompanied by tissue alterations of the pancreas as observed by light and electron transmission microscopy.

The histopathologic changes observed in the pancreatic tissue were swollen or partially destroyed mitochondria, RER alterations (enlargement and decrease of ribosome number) and vacuolar degeneration. Several studies on human pancreas showed similar lesions in patients dying of severe trauma or septic shock.^{15,31} One horse (number 10) presented with the most severe pancreatic damage; this animal suffered from incarceration of 10 m jejunum and ileum in the epiploic foramen and had severe signs of shock, so that hypoperfusion as well as direct compression of the pancreas would be at the origin of the damage. The pancreatic lesions we observed can thus be linked to ischaemic damage consecutive to hypoperfusion or mechanical compression, but they cannot be attributed to autodigestion of the gland since the pancreas was removed before euthanasia and the tissue samples excised and treated directly in the surgical room. Moreover, control pancreatic samples were obtained in the same conditions from horses without shock and showed normal structure.

A previous study of Tribl and collaborators²⁹ found reduced pancreatic function in patients with septic shock, but not in non-septic shock patients. Thus hypoperfusion was not the only mechanism incriminated in the observed pancreatic pathology, but the activation of neutrophils could be considered as playing a role. We previously demonstrated that neutrophils were stimulated in acute abdominal disease and measured increased plasma concentrations of myeloperoxidase, a marker of neutrophil degranulation.⁹ Myeloperoxidase and other inflammatory mediators could be released by aggregation and trapping of neutrophils in splanchnic capillaries, exacerbating the ischemia-reperfusion injury of the pancreas and the local inflammatory reaction. However, no infiltration of the pancreatic tissue by leucocytes was observed in our study.

But whatever the mechanisms that resulted in pancreatic damage, our observations demonstrated that the pancreas was involved in the pathophysiology and evolution of equine acute abdomen. Pancreatic failure cannot be regarded unequivocally as the cause of the acute abdomen, but it can be postulated that it was an aggravating factor in the disease. When acinar cells release active trypsin, the consequences need not be limited to intrapancreatic activation of the other zymogens and damage only to pancreatic tissues.²³ Active trypsin in blood flow

plays a role in the activation of the complement and coagulation cascade, on neutrophil stimulation, and on protein degradation and proenzyme activation, despite the presence of plasma anti-proteases as demonstrated in pancreatitis.^{8,21} Indeed, it has been demonstrated that the activation of the blood cascades and the release of active enzymes could overload the anti-protease capacity of the blood and that trypsin bound to α_2 macroglobulin (its main plasmatic inhibitor) remains active against low molecular weight substrates.¹⁷ These systemic effects without doubt contribute to the morbidity and the onset of multiple organ failure such as lung failure.¹² But, in horses, little is known about the effect of trypsin in blood. More cases should be investigated in order to see if pancreatic damage could explain several mechanisms of continuing shock even after the resection of devitalised intestine.

Acknowledgements

This work was supported by a FRSM (National Fund for Scientific Medical Research – Belgium) grant n° 3.4615.98. Special thanks to J.F. Bradfer of the Electron Microscopy Unit of the Faculty of Veterinary Medicine (University of Liège) for technical assistance as well as to Prof. Dessy of the Department of Histology and to Dr. E. Jacquinet of the Department of Pathology for scientific advice.

References

1. Cullmann W, Dick W: A chromogenic assay for evaluation of α_2 -macroglobulin level in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Chem Clin Biochem* **19**:287-290, 1981
2. Deby-Dupont G, Haas M, Pincemail J, Braun M, Lamy M, Deby C, Franchimont P: Immunoreactive trypsin in the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* **10**: 7-12, 1984
3. Endrich B, Klar E, Hammersen F: The microcirculation of the pancreas: State of the art. *In: Gastrointestinal microcirculation*, ed. Messmer K, Hammersen F, pp. 144-174. Karger, Basel, Switzerland, 1990
4. Fernandez-del Castillo C, Harringer W, Warshaw AL, Vlahakes GJ, Koski G, Zaslavsky AM, Rattner DW: Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* **325**:382-387, 1991
5. Florholmen J, Revhaug A, Burhol PG, Giercksky KE, Olsen RL: Effect of intravenous and intraduodenal administration of Escherichia coli endotoxin on the porcine pancreas as evaluated by changes in the serum cationic trypsin-like immunoreactivity. *Scand J Gastroenterol* **20**:279-284, 1985

6. Florholmen J, Lindal S, Rokke O, Olsen R, Burhol PG, Revhaug A: Effects of endotoxin on the pancreatic ultrastructure. *APMIS* **96**:991-996, 1988
7. Forsyth RP, Hoffbrand BI, Melmon KL: Redistribution of cardiac output during haemorrhage in the unanaesthetized monkey. *Circulation Research* **27**:311-320, 1970
8. Garcia-Szabo RR, Johnson AJ, Malik AB: Leukocytes are required for trypsin-induced increase in lung vascular permeability. *Am J Pathol* **124**:377-382, 1986
9. Grulke S, Benbarek H, Caudron I, Deby-Dupont G, Mathy-Hartert M, Farnir F, Deby C, Lamy M, Sertejn D: Plasmatic myeloperoxidase level and polymorphonuclear neutrophil activation in horses suffering from large intestine obstruction requiring surgery: preliminary results. *Can J Vet Res* **63**:142-147, 1999
10. Grulke S, Olle E, Detilleux J, Gangl M, Caudron I, Sertejn D: Determination of a gravity and shock score for the prognosis in equine surgical colic. *J Vet Med A*, **48**:465-473, 2001
11. Grulke S, Gangl M, Deby-Dupont G, Caudron I, Deby C, Sertejn D: Plasma trypsin level in horses suffering from acute intestinal obstruction. *Vet J*, in press,
12. Hartwig W, Werner J, Jimenez RE, Z'graggen K, Weimann J, Lewandrowski KB, Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C: Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury. *Am J Physiol* **277**:G1008-G1016, 1999
13. Hegewald G, Nikulin A, Gmaz-Nikulin E, Plamenac P, Bärenwald G: Ultrastructural changes of the human pancreas in acute shock. *Pathol Res Pract* **179**:610-615, 1985
14. Jones MS, Kreisberg JI, Linhardt GE, Trump BF: Studies of the ischemic pancreas in shock. *Adv Shock Res* **1**:197-207, 1979
15. Jones RT, Garcia JH, Mergner WJ, Pendergrass RE, Valigorsky JM, Trump BF: Effects of shock on the pancreatic acinar cell. *Arch Pathol* **99**:634-644, 1975
16. Klar E, Schratt W, Foitzik T, Buhr H, Herfarth C, Messmer K: Impact of microcirculatory flow pattern changes on the development of acute edematous and necrotizing pancreatitis in rabbit pancreas. *Dig Dis Sci* **39**:2639-2644, 1994
17. Largman C, Johnson JH, Brodrick JN, Geokas HC: Proinsulin conversion to desalanyl insulin by α_2 -macroglobulin-bound trypsin? *Nature* **269**:168-170, 1977
18. Lottenberg R, Hall JA, Blinder M, Binder EP, Jackson CM: The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions. *Biochim Biophys Acta* **742**:539-557, 1983
19. Morrissey R, Berj JE, Fridhandler L, Pelot D: The nature and significance of hyperamylasemia following operation. *Ann Surg* **180**:67-71, 1980

20. Nicod L, Leuenberger P, Seydoux C, Rey F, Van Melle G, Perret C: Evidence for pancreas injury in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **131**:696-699, 1985
21. Ohlsson K: Experimental pancreatitis in the dog. Appearance of complexes between proteases and trypsin inhibitors in ascitic fluid, lymph, and plasma. *Scand J Gastroenterol* **6**:645-652, 1971
22. Parry BW, Crisman MV: Serum and peritoneal fluid amylase and lipase reference values in horses. *Equine Vet J* **23**:390-391, 1991
23. Rinderknecht H: Pancreatic secretory enzymes. *In: The Pancreas Biology, Pathobiology and Disease*, ed. Vay Liang W. Go, et al., second ed., pp. 219-251. Raven Press, Ltd., New York, USA, 1993
24. Rutherford RB, Trow RS: The pathophysiology of irreversible hemorrhagic shock in monkeys. *J Surg Res* **14**:538-550, 1973
25. Rutherford RB, Balis JV, Trow RS, Graves GM: Comparison of hemodynamic and regional blood flow changes at equivalent stages of endotoxin and hemorrhagic shock. *J Trauma* **16**:886-97, 1976
26. Smith-Erichsen N, Aasen AD, Amundsen E: Treatment of sepsis in the surgical patient evaluated by means of chromogenic peptide substrate assays. *Acta Clin Scand* **509**:33-38, 1982
27. Svendsen L, Blomback B, Blomback M, Olsson PI: Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*, **98**:446-454 1972
28. Traverso LW, Ferrari BT, Buckberg GD, Tompkins RK: Elevated postoperative renal clearance of amylase without pancreatitis after cardiopulmonary bypass. *Am J Surg* **133**:298-303, 1977
29. Tribl B, Madl C, Mazal PR, Schneider B, Spitzauer S, Vogelsang H, Gangl A: Exocrine pancreatic function in critically ill patients : Septic shock versus non-septic patients. *Crit Care Med* **28**:1393-1398, 2000
30. Venneman I, Deby-Dupont G, Lamy M: Pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *In: Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*, ed. Vincent JL, pp. 297-308, Springer Verlag, Berlin, FRG, 1993
31. Warshaw AL, O'Hara PJ: Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann Surg* **188**:197-201, 1978
32. Weaver D, Busuito M, Bouwman D, Wilson R: Interpretation of serum amylase levels in the critically ill patient. *Crit Care Med* **13**:532-533, 1985

Liste des abréviations

AC acétylcholine
ACP acépromazine
ADP adénosine nucléotide diphosphate
AMP adénosine nucléotide monophosphate
ATP adénosine nucléotide triphosphate
CL chimioluminescence
COX-1 cyclooxygénase constitutive
COX-2 cyclooxygénase inductible
E étranglé
EDTA sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique
EPO éosinophile peroxydase
FAD flavine adénine dinucléotide
FAO formes activées de l'oxygène
GSH/GSSG glutathion réduit/oxydé
HE hématoxiline-éosine
IC indice de choc
IG indice de gravité
IL interleukine
LBP lipopolysaccharide binding protein
LPS lipopolysaccharides
LSM « least square means »
LT leukotriène
ME microscopie électronique à transmission
MMP métalloprotéinase matricielle (matrix metalloproteinase)
MO microscopie optique
MPO myéloperoxydase
NAD(H) nicotinamide adénine dinucléotide
NADP(H) nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NE non étranglé
NF « nuclear factor »
NOsynthase synthase du monoxyde d'azote
PAF facteur agrégeant plaquettaire (« platelet activating factor »)
PG prostaglandine
PMA phorbol myristate acétate
PMN polymorphonucléaire neutrophile
PO post-opératoire
RIA « radio- immunoassay »
ROS « reactive oxygen species »
RNOS « reactive nitrogen and oxygen species »
SD « standard deviation »
SLPI secretory leukoprotease inhibitor
SOD superoxyde dismutase
SDRA syndrome de détresse respiratoire aiguë
t-PA activateur tissulaire du plasminogène (« tissue-plasminogen activator »)
TEA trypsine enzymatiquement active

TF facteurur tissulaire « tissue factor »
TIR trypsine immuno-réactive
TNF « tumor necrosis factor »
TX thromboxane
XH/XOx xanthine déshydrogénase/xanthine oxydase

Liste des formules chimiques et symboles

Cl⁻ : anion chlorure
·Cl : radical chloryle
CO₂ : dioxyde de carbone
D· : radical secondaire
DH : réducteur (substrat donneur d'électrons)
HOCl : acide hypochloreux
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
L: ligand activateur du fer
NO· ou NO : monoxyde d'azote (nitric oxide)
·NO₂ : radical du dioxyde d'azote ou radical nitryle
NO₂⁺ : ion nitronium
NO₂⁻ : nitrite
NO₃⁻ : nitrate
O₂ : oxygène fondamental
¹O₂ : oxygène singulet
O₂^{·-} : anion superoxyde
O₃ : ozone
·OH : radical hydroxyle
ONOO⁻ : peroxy nitrite
ONOOH : forme acide du peroxy nitrite
ONOOCO₂⁻ : nitrosoperoxy carboxylate
RH : molécule lipidique insaturée (acide gras par exemple)
R· : radical alkyle dérivé de RH
RO· : radical alkoxy dérivé de RH
ROO· : radical peroxy dérivé de RH
ROOH : hydroperoxyde dérivé de RH
ROH : alcool dérivé de RH
- SH : thiol

Liste des figures

- Fig. 1a** Obstruction simple du gros intestin. **1b** Obstruction étranglée de l'intestin grêle.
- Fig. 2** Schéma de la cascade des principales espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS: « reactive nitrogen oxygen species ») *in vivo*.
- Fig. 3** Résumé des principaux effets exercés *in vivo* par les espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS).
- Fig. 4** Les RNOS produits par le PMN activé et leurs effets.
- Fig. 5** Principaux médiateurs produits par les PMN activés
- Fig. 6** Effets de la trypsine au niveau sanguin et dans l'activation des proenzymes du pancréas
- Fig. 7** Protocole d'examen
- Fig. 8a et b** Lésions vasculaires de l'intestin grêle
- Fig. 9** Fiche de soins intensifs pour le suivi des paramètres et des traitements.
- Fig. 10** Distribution des pathologies chirurgicales (n = 206)
- Fig. 11** Incidence des différents types d'obstructions de l'intestin grêle
- Fig. 12** Incidence des différents types d'obstructions du gros intestin
- Fig. 13** Taux de survie en fonction des 3 grades de l'indice de gravité et des ses composants.
- Fig. 14** Temps de récupération moyen en fonction de l'indice de gravité
- Fig. 15** Temps de récupération moyen en fonction de l'indice de choc
- Fig. 16** Variation du taux plasmatique de MPOE chez 25 chevaux souffrant de pathologies abdominales aiguës
- Fig. 17** Valeurs moyennes (SD) des valeurs pics de MPOE pour l'obstruction du gros intestin
- Fig. 18** Moyenne de TEA obtenue en fonction de l'IC 1-3.
- Fig. 19** Evolution de la TEA moyenne (et déviation standard) pendant les phases P1 à P3
- Fig. 20** Pancréas exocrine, structure bien conservée, microscopie optique
- Fig. 21** Pancréas exocrine, cheval en choc, vacuoles, microscopie optique
- Fig. 22** Pancréas exocrine, ultrastructure est bien conservée, microscopie électronique à transmission (ME)
- Fig. 23** Pancréas exocrine, cheval en choc, dilation des citernes du RER, ME
- Fig. 24** Pancréas exocrine, cheval en choc, dilatation de mitochondries, ME

Liste des tableaux

- Tableau I** Classification des principales pathologies intestinales chirurgicales et obstructives
- Tableau II** La nature des lésions histo-pathologiques de l'intestin grêle pour chaque graduation
- Tableau III** Ensemble des réactions contrôlées par la MPO
- Tableau IV** Description des paramètres composant l'indice de choc (IC)
- Tableau V** Evolution des taux de TIR pour 3 chevaux souffrant d'obstruction non étranglée
- Tableau VI** Evolution des taux de TIR pour 7 chevaux souffrant d'obstruction étranglée
- Tableau VII** Chevaux ayant subi un examen pancréatique classés en fonction de l'IC et leur valeur de TEA lors de la réception