



**HAL**  
open science

# Mode opératoire : Prélèvement de tissus intestinaux chez les oiseaux d'élevage pour analyse histologique par microdissection

Maryse Leconte, Irène Gabriel

## ► To cite this version:

Maryse Leconte, Irène Gabriel. Mode opératoire : Prélèvement de tissus intestinaux chez les oiseaux d'élevage pour analyse histologique par microdissection. 2019. <hal-03794839>

**HAL Id: hal-03794839**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03794839v1>**

Submitted on 3 Oct 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

## **Mode opératoire**

### **Prélèvement de tissus intestinaux chez les oiseaux d'élevage pour analyse histologique par microdissection**

Date d'émission : 05/06/2019

Rédaction : Maryse Leconte

Revu par : Irène Gabriel

Version : n°2 (n°1 en 2011 ; AQ 0157)

Diffusion : Personnels de laboratoires et d'élevage travaillant sur l'appareil digestif des volailles

**Mots clés : Poulet, intestin, histologie, microdissection, prélèvement, fixation, conservation**

## **SOMMAIRE**

**1 Objet - Domaine d'application**

**2 Principe**

**3 Réactifs**

**4 Matériel**

**5 Mode opératoire**

**6 Hygiène et sécurité**

**7 Références bibliographiques**

**8 Annexes**

## 1. OBJET - DOMAINE D'APPLICATION

Réalisation de prélèvements de petites sections de tissus intestinaux (intestin grêle, région proximale des caeca) pour l'analyse histologique par microdissection permettant entre autres de déterminer la morphométrie des villosités et cryptes intestinales (hauteur / largeur / surface des villosités ; profondeur / largeur / surface des cryptes). Cette méthode est issue de la méthode de Goodlad et al (1991) chez l'Homme, et a été utilisée chez le veau (Montagne et al., 1999) et le porc (Salgado et al., 2001). Elle a été utilisée chez le poulet et la dinde au niveau de l'intestin grêle (Gabriel et al, 2007, 2008) et chez le poulet au niveau des caeca (Boumart et al, 2012).

## 2. PRINCIPE

Après le prélèvement du tissu intestinal, il est fixé, puis mis dans une solution permettant sa conservation jusqu'à son analyse.

## 3. RÉACTIFS

### 3.1. Liquide physiologique

NaCl (9 g/l) conservé à 4°C une semaine maximum  
Prévoir environ 40 ml / échantillon (on peut réduire à 25 ml)

### 3.2. Tampon formol (Conservation à 4°C pendant 1 mois)

Rq : Manipuler sous hotte et mettre des gants (voir Paragraphe 6.2. Sécurité / Toxicité) ; La solution finale doit être étiquetée 'Nocif'

#### 3.2.1. Préparation du tampon

Prévoir 3 ml / échantillon (On peut réduire à 1,5 ml)

En fonction des **acides et bases disponibles** (degré d'hydratation des sels)

Produits	Quantités pour 1 litre
Formol 37% <sup>1</sup>	90 ml
Eau distillée	810 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (30 mM)	4.14 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (41 mM)	5.85 g
NaOH ou HCl	Ajuster le pH à 7.6
Eau distillée	Qsp 1 litre

<sup>1</sup> Formaldéhyde 37% (contient ≈ 10% de méthanol pour limiter la polymérisation du formaldéhyde) (VWR, 1 litre ; ref 20.913.294) ; **S'assurer qu'il n'est pas polymérisé** (présence d'un bloc opaque)

Produits	Quantités pour 1 litre
Formol 37%	90 ml
Eau distillée	810 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O (30 mM) <sup>2</sup>	4.68 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O (41 mM) <sup>2</sup>	14.75 g
NaOH ou HCl	Ajuster le pH à 7.6
Eau distillée	Qsp 1 litre

### **3.2.2. Pré-remplir les tubes et les conserver à 4°C**

Pour chaque échantillon : tubes de 5 ml avec 3 ml de tampon formol

Rq : On peut réduire les volumes en utilisant des microtubes de 2 ml avec 1,5 ml de tampon formol

### **3.3. Ethanol 70 %**

Prévoir 12 ml / échantillon

Rq : On peut réduire à 4,5 ml

## **4. MATÉRIEL**

### **4.1. Installation de laboratoire**

- Hotte (présence de Formol) (voir Paragraphe 6.2. Sécurité / Toxicité)

Rq : Pour les prélèvements sur des sites d'élevage sans hotte, se placer dans un endroit très ventilé

### **4.2. Matériel chirurgical**

- Gros ciseaux (Ouverture de l'animal, prélèvement du segment intestinal)

- Ciseaux fin (Prélèvement du segment de tissu intestinal puis coupure longitudinale du segment)

- Pince pour tenir l'échantillon au moment des rinçages avec du liquide physiologique et pour le rinçage à l'éthanol

### **4.3. Matériel de laboratoire**

- Tubes avec bouchons à ailettes supportant le formaldéhyde (Ex : Polystyrène)

Volume de 5 ml

Rq : on peut réduire à des microtubes de 2 ml

- Portoir adapté

- 3 Bêchers de 100 ml pour les rinçages avec du liquide physiologique

- Marqueur indélébile (Ne doit pas s'effacer avec le formol et l'éthanol)

- Papier absorbant

- Glace pilée ou réfrigérateur (4°C) pour la conservation des échantillons dans le formol pendant les prélèvements

- En cas de transport entre le lieu de prélèvement et le lieu de rinçage des échantillons, prévoir des boîtes hermétiques avec des blocs de glace (ex : boîtes de polystyrène)

## **5. MODE OPÉRATOIRE**

Le temps entre la mort de l'animal et la mise de l'échantillon dans le formol doit être le plus court possible (env 5-10 min si possible) du fait de la rapide dégradation des tissus intestinaux. Cependant, les modifications morphologiques étant d'ampleur nettement inférieures aux modifications biochimiques, les échantillons prélevés pour l'histologie

peuvent ne pas être considérés comme prioritaires par rapport à d'autres prélèvements (Loehry et Creamer, 1966 ; Pearson et Logan, 1978).

Rq : Pour une organisation optimale des prélèvements, prévoir

- une personne pour la mise à mort des animaux
- une (ou deux) personnes pour l'ouverture de l'animal et prélèvement du(des) segment(s) intestinal(aux)
- une personne pour le prélèvement du morceau de chaque segment intestinal, ses rinçages et sa fixation dans le tampon formol.

**Rq : Mettre des gants et travailler dans une zone ventilée (Voir Paragraphe 6.2. Sécurité / Toxicité)**

### 5.1. Mise à mort des animaux

Utiliser une méthode n'entraînant pas de modification histo-morphologique intestinale.

### 5.2. Ouverture de l'animal et prélèvement des segments intestinaux

A l'aide de gros ciseaux, ouvrir la cavité abdominale de l'animal, retirer l'appareil digestif, et prélever les segments intestinaux d'intérêt

### 5.3. Prélèvements

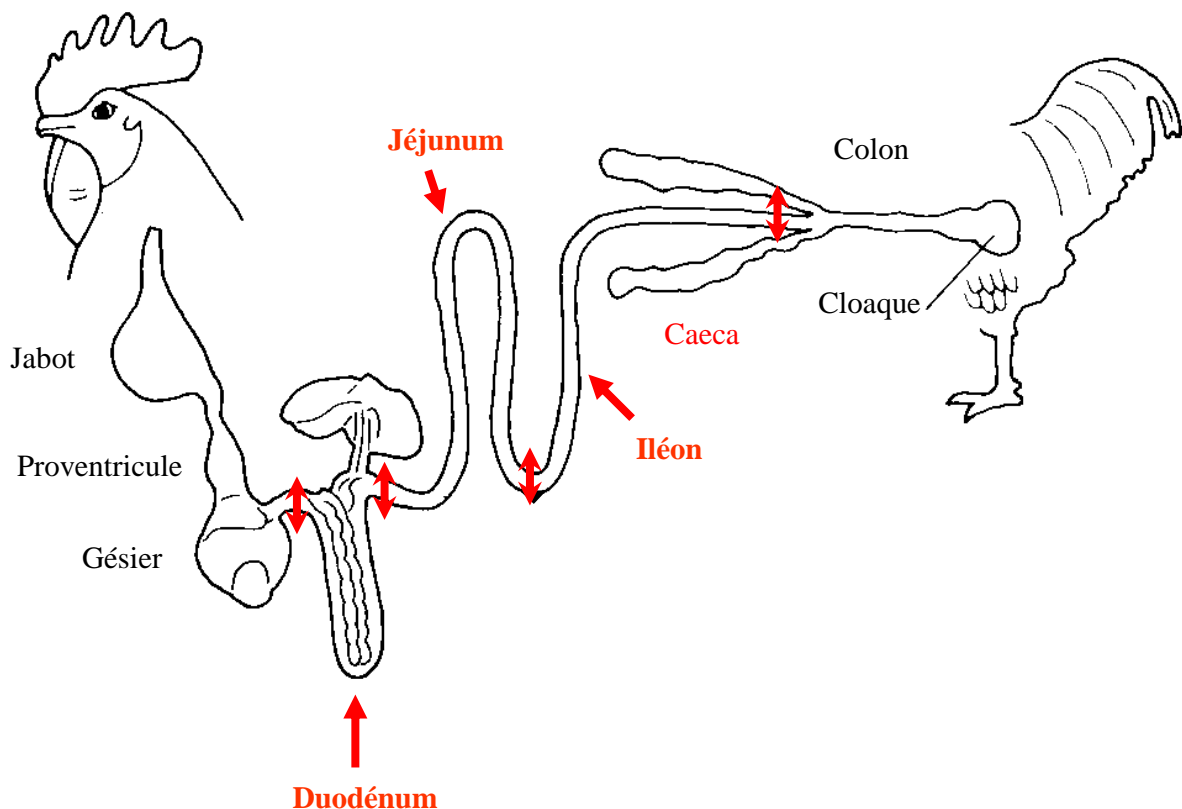


Figure 1 : Schéma de l'appareil digestif de l'oiseau et des différents segments intestinaux

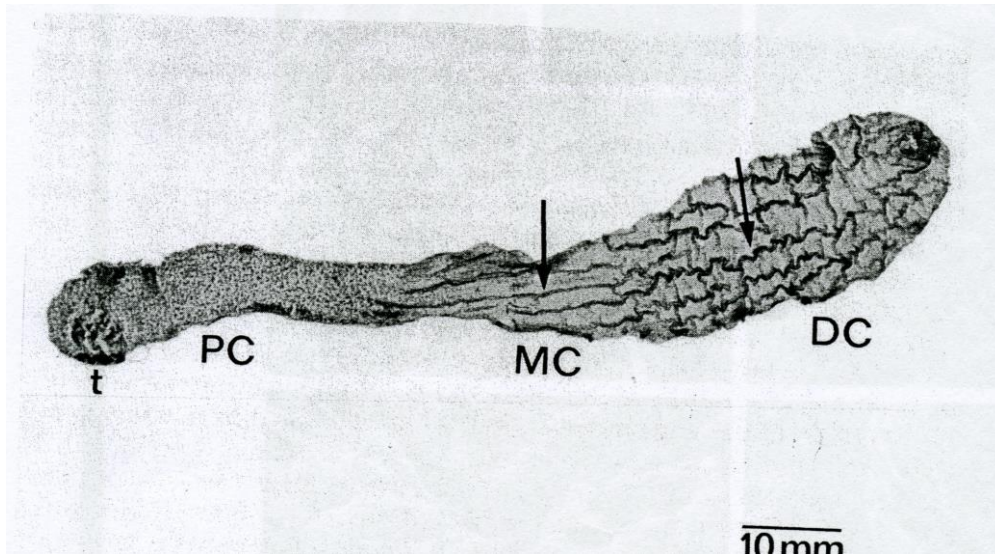


Figure 2 : Les différentes parties des caeca

PC : caecum proximal (côté iléon); MC : caecum median ; DC : caecum distal

### 5.3.1. Couper un morceau de segment digestif situé au milieu du segment étudié\*

\* Duodénum, jéjunum, iléon ou caecum proximal (seule partie des caeca possédant des villosités donc étudiable par microdissection des villosités avec leur crypte)

Prélever 0.5 cm de segment maximum, pour que le rapport 'volume de tissu / volume de formol' permette une fixation correcte, soit un rapport de 1/10 au maximum

**Attention aux tissus qui gonflent** dans le tampon formol (Ex : duodénum) :

Diminuer le rapport « volume de tissu / volume de formol »

Rq : **Une mauvaise fixation des tissus entraîne leur dégradation**

### 5.3.2. Couper le segment digestif longitudinalement au ciseau

Rq : Couper longitudinalement au ciseau le long du mésentère (Permet de garder un repère, et d'éviter des difficultés de manipulation des échantillons lors du prélèvement des villosités)

Rq : On peut réduire la taille des échantillons pour limiter les volumes de réactif (Tampon formol, Ethanol 70%) et la taille des tubes à stocker

## 5.4. Nettoyage de l'échantillon prélevé

**Eliminer les contenus digestifs avec du liquide physiologique** (NaCl 9g/l) maintenu à **température ambiante** pendant les prélèvements

5.4.1. Prendre le morceau d'intestin avec une pince

5.4.2. Secouer le morceau dans un béccher contenant du liquide physiologique pour éliminer les contenus digestifs adhérents

5.4.3. Renouveler l'opération dans 2 autres bécchers

Rq : En moyenne, changer le liquide physiologique des béchers tous les 6 échantillons (Renouveler plus fréquemment en cas de grandes quantités de contenu digestif)

Rq : En cas de contenus digestifs très adhérents (Ex : contenus parfois visqueux dans les caeca) tamponner très légèrement le tissu sur du papier absorbant (sans détériorer la muqueuse) pour éliminer les contenus digestifs ne s'éliminant pas avec les bains de liquide physiologique

### **5.5. Fixation dans le tampon formol**

**Attention** : Mettre des gants et travailler sous hotte (Pour les prélèvements sur des sites d'élevage, se placer dans un endroit très ventilé)

**Mettre le morceau de tissu** dans le tube de **tampon formol** pré-rempli (maintenu au froid dans la glace)

**Rq : S'assurer que le morceau de tissu ne colle pas aux parois du tube, entraînant une mauvaise fixation et donc une détérioration des tissus**

**L'échantillon doit rester entre 4h et 20h\* maximum dans le tampon formol au froid** (à 4°C ou dans une boîte de polystyrène avec des blocs de glace pour le transport au laboratoire)

\* Temps définis pour des échantillons d'intestin de porcelet ; Pour des échantillons intestinaux de poulet (Duodénum, jéjunum et iléon), il est possible de laisser les échantillons 24h sans conséquence pour les échantillons.

## **5.6. Rinçages avant stockage dans l'éthanol 70%**

**Attention** : Mettre des gants et travailler sous hotte

### **Rq : Organisation du temps :**

Les échantillons prélevés le matin doivent être traités l'après-midi

Les échantillons prélevés l'après-midi doivent être traités le lendemain matin

Rq : Temps nécessaire pour une personne : 1,5 min / échantillon

**5.6.1. Vider le tampon formol** dans un récipient adéquat (pour retraitement des déchets) en retenant l'échantillon avec une pince

**5.6.2. Remplir le tube avec 4 ml d'éthanol 70%** (ou 1,5 ml si microtube) à la pipette en le faisant couler doucement le long de la paroi (pour ne pas abîmer l'échantillon)

**5.6.3. Faire des cycles d'aspiration-refoulement** de l'éthanol, de manière à mettre l'échantillon en suspension et favoriser le remplacement du tampon formol par l'éthanol

**5.6.4. Vider à nouveau** dans le récipient pour retraitement des déchets, et **renouveler 2 autres fois les opérations**

**5.6.5. Laisser les échantillons dans le dernier bain d'éthanol 70%**

## **5.7. Conservation** dans éthanol 70% (4°C)

Conservation pendant des mois (1 an voir plus, sans problème)

Rq : Transport des échantillons en les maintenant au froid (Bloc de glace dans boîte de polystyrène)

## **6 HYGIÈNE ET SÉCURITÉ**

### **6.1. Traitements des déchets**

Lors de l'étape de lavage de l'échantillon, le tampon formol et les différents lavages doivent être vidés dans un récipient adéquat (pour retraitement des déchets de laboratoire)

### **6.2. Sécurité / Toxicité**

#### **Formaldéhyde**

Synonymes : aldéhyde formique ; formol

#### **Fiche de toxicité (INRS, 2011)**

[www.inrs.fr/accueil/dms/inrs/FicheToxicologique/TI-FT-7/ft7.pdf](http://www.inrs.fr/accueil/dms/inrs/FicheToxicologique/TI-FT-7/ft7.pdf)

#### **Etiquetage**

**Selon le règlement CLP (Classification, étiquetage (Labelling) et emballage (Packaging))**

H 351 : Susceptible de provoquer le cancer

H 331 : Toxique par inhalation  
 H 311 : Toxique par contact cutané  
 H 301 : Toxique en cas d'ingestion  
 H 314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves  
 H 317 : Peut provoquer une allergie cutanée

**Selon la directive 67/548/CEE**

**Formaldehyde > 25%**

R 23/24/25 : Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion  
 R 34 : Provoque des brûlures  
 R 40 : Effet cancérogène suspecté ; preuves insuffisantes  
 R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau  
 S 26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste  
 S 36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux / du visage  
 S 45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)  
 S 51 : Utiliser seulement dans des zones bien ventilées

**Valeur limite d'exposition professionnelle**

Valeurs limites indicatives de Moyenne d'Exposition pondéré (VEL) (8h/jour ; 40h/semaine) et valeurs limites indicatives d'exposition à court terme (15 min au maximum) dans l'air des locaux de travail :

Pays	Moyenne pondérée sur 8 heures		court terme (15 min au maximum)	
	ppm	mg/m <sup>3</sup>	ppm	mg/m <sup>3</sup>
France (circulaire 1993)	0.5	0.61	1	1.23
France Afsset (2008) *	0.2	0.25	0.4	0.5
Etats-Unis (ACGIH)	-	-	0.3	0.37
Allemagne (Valeurs MAK)	0.3	0.37	-	-

\* Recommandation de l'AFSSET : Voir [www.anses.fr](http://www.anses.fr)

→ **Mettre des gants et travailler sous une sorbonne avec volet coulissant de la préparation de la solution à son élimination**

Les **gants** en nitrile, néoprène **et** butyle offrent une bonne résistance au formaldéhyde

Rq : **Sorbonne** de laboratoire, pour les VME comprises entre 1 et 400 ppm

Système clos et étanche type boîte à gants, VME < 1 ppm

\* VME : Valeur Maximale d'Exposition

Voir aussi Fiche de l'IRSST (Canada, 2006)

<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/rg-471.pdf>

Rq : Pour les prélèvements sur des sites d'élevage, se placer dans une zone bien ventilée (ex : proche d'une porte ouverte avec un courant d'air ou sous hotte portative)

## 7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boumart, Z., Roche, S., Lalande, F., Virlogeux-Payant, I., Hennequet –Antier, C., Menanteau P., Gabriel, I., Xavier-Weill, F., Velge, P., Chemaly, M. (2012). Heterogeneity of persistence of Salmonella enterica serotype Senftenberg strains could explain the emergence of this serotype in poultry flocks. Plos-One, 7(4), e35782. Epub 32012 Apr 35724
- Gabriel, I., Quimerc'h, S., Vivien, S., Mallet, S., Travel, A., Chevalier, D., Bouvarel, I. (2007). Caractérisation des troubles digestifs non spécifiques chez le dindonneau par morphométrie de l'intestin grêle. Septièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, pp 357-361.
- Gabriel, I., Mallet, S., Leconte, M., Travel, A., Lalles, J.P. (2008). Effects of whole wheat feeding on the development of the digestive tract of broiler chickens. Animal Feed Science and Technology 142, 144-162.
- Goodlad, R.A., Levi, S., Lee, C.Y., Mandir, N., Hodgson, H., Wright, N.A. (1991). Morphometry and cell proliferation in endoscopic biopsies: evaluation of a technique. Gastroenterology, 101, 1235-1241.
- Loehry CA, Creamer B. (1966). Post-mortem Study of Small-intestinal Mucosa. Br Med J 1:820 822-829.
- Montagne, L., R. Toullec, Savidge, T., Lalles, J. P. (1999). "Morphology and enzyme activities of the small intestine are modulated by dietary protein source in the preruminant calf." Reproduction Nutrition Development 39(4): 455-466.
- Pearson GR, Logan EF. (1978). The rate of development of postmortem artefact in the small intestine of neonatal calves. Br J Exp Pathol 59:178-182.
- Salgado, P., J. P. Lallès, Toullec, R., Mourato, M., Cabral, F., Freire, J. P. B. (2001). "Nutrient digestibility of chickpea (Cicer arietinum L.) seeds and effects on the small intestine of weaned piglets." Animal Feed Science and Technology 91: 197-212.

## 8. ANNEXES

Coloration pour mesure de la morphologie des villosités et des cryptes (hauteur, largeur) : voir mode opératoire « Mesure de la taille des villosités et des cryptes intestinales chez les oiseaux d'élevage par analyse histologique par microdissection »

Coloration des cellules à mucus : voir mode opératoire « Méthode de coloration des cellules à mucus au niveau de la muqueuse intestinale » n°0083-MO-0156