

Mode opératoire
MESURES DE LA TAILLE
DES VILLOSITÉS ET DES CRYPTES INTESTINALES
CHEZ LES OISEAUX D'ÉLEVAGE
PAR ANALYSE HISTOLOGE PAR MICRODISSECTION

Date d'émission : 05/06/2019

Rédaction : Maryse Leconte

Revu par : Irène Gabriel

Version : n°1

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

Mots clés : Poulet, intestin, histologie, microdissection, villosité, crypte, taille

SOMMAIRE

- 1. Objet - Domaine d'application**
- 2. Principe**
- 3. Réactifs**
- 4. Matériel**
- 5. Mode opératoire**
- 6. Hygiène et sécurité**
- 7. Références bibliographiques**
- 8. Annexe**

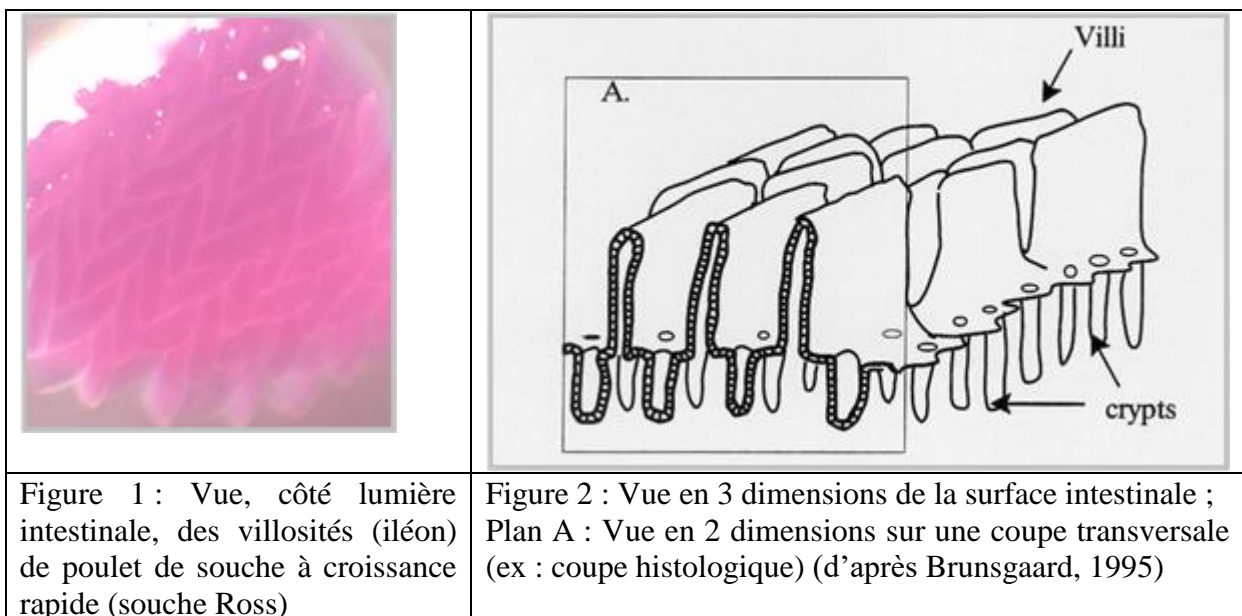
1. OBJET - DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet, après les prélèvements des tissus intestinaux selon le protocole indiqué dans l'annexe, de déterminer la taille des villosités et des cryptes intestinales (hauteur, largeur, surface, ratio villosité / crypte) chez les oiseaux d'élevage (poulet, dinde, canard).

2. PRINCIPE

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles du tube digestif sont d'une grande importance pour les mécanismes de digestion et d'absorption des nutriments conduisant aux performances des animaux. L'intestin grêle en particulier est un organe d'une importance fondamentale dans les processus de digestion et d'absorption. Il existe une corrélation importante entre activité enzymatique / capacité d'absorption et morphologie (Henning, 1979; 1984; Meddings and Theisen, 1989).

Dans la plupart des études déterminant la taille des villosités et des cryptes intestinales, la technique utilisée s'effectue sur des coupes effectuées dans le sens transversal des villosités (plan A sur la figure 2). Comme les villosités chez le poulet de chair sont plutôt rectangulaires et aplaties, cette méthode permet de déterminer la hauteur et l'épaisseur de la villosité, ainsi que la profondeur des cryptes, mais non la surface des villosités, correspondant à la **surface d'absorption**. Une technique permettant de déterminer cette surface d'absorption est la technique de **microdissection** présentée dans ce protocole. Pour ce faire, chaque villosité est disséquée, puis sa hauteur et sa largeur sont mesurées, ainsi que la taille des cryptes associées. Concernant la surface, aussi bien des villosités que des cryptes, elle peut, soit être mesurée, soit estimée par calcul à partir de la hauteur et de la largeur si les villosités et les cryptes sont de forme rectangulaire.



Pour information, au niveau des muqueuses, les tailles de villosités peuvent présenter des variabilités assez importantes, avec des villosités de taille deux fois plus faible que la majorité et de largeur 4 à 5 fois plus faible. Leur importance relative en termes de surface est donc très faible par rapport aux villosités les plus fonctionnelles de taille « normale ».

Dans une première approche, on peut considérer que la mesure des villosités de taille « normale » est suffisante pour estimer les capacités d'absorption de la muqueuse. Cette méthode permet de mettre en évidence des différences liées à des traitements assez différents entre groupes expérimentaux (Ex : Perry et al, 1991).

Cependant, pour une analyse plus fine, ces mesures peuvent aussi être effectuées sur des villosités de taille représentative de l'ensemble des villosités obtenues après microdissection des échantillons. Ce type de mesures, plus longues, peuvent dans certains cas mettre en évidence des différences entre traitements étudiés. En effet une hétérogénéité intra-individuelle de la taille des villosités et/ou des cryptes de la muqueuse intestinale peut traduire un dysfonctionnement de celles-ci (Gabriel et al 2007).

3. RÉACTIFS

Acide acétique 3 % et 45 %

Acide acétique Normapur® 100% (Prolabo)

Solution à 3% : 3ml d'acide acétique complété à 100ml d'eau déminéralisée

Solution à 45% : 45ml d'acide acétique complété à 100ml d'eau déminéralisée

Bleu Alcian 1% PH 2.5

Bleu Alcian 8Cx (Sigma 10g ; Ref : A3157).

Préparer une solution à 1% : 1g de bleu d'alcian dans 100ml d'acide acétique 3%

Réactif de Schiff

Réactif de Schiff (Sigma Aldrich ;Ref: 3952016 ; 500ml)

Éthanol 50%

Acide périodique

Acide périodique (Sigma ;Ref : P0430 ; 100g).

Préparer une solution à 1% : 1g dans 100ml d'eau déminéralisée.

Produit de montage aqueux des lames pour microscopie

Aquatex ® (Merck ; réf : OC 684726)

4. MATÉRIEL

4.1. Appareillage

Microscope à dissection (stéréoscope) avec 2 sources de lumière froide (fibres optiques)

Microscope avec camera (Scion CFW-1310C Color 1394)

Logiciel de capture d'image (Visicapture)

Logiciel d'analyse d'image (Visilog Viewer Version 1.0)

4.2. Matériel

Pour la préparation des solutions indiquées dans la partie « réactif »

Béchers

Pour la coloration

Boîte de pétri

Pipettes Pasteur

Tubes de 5 ml avec bouchons

Pour la dissection :

Pinces de dissection (bouts arrondis)

Aiguille de dissection à pointe droite




Scalpel + Lame

Matériel d'histologie

Lames et lamelles

5. MODE OPÉRATOIRE

Reprise des prélèvements conservés à 4°C dans une solution d'éthanol 70 % .

		
Prélèvements conservés dans l'éthanol	Mettre l'échantillon dans une boîte de pétri, séreuse côté boîte et muqueuse côté manipulateur Couper un morceau de 5 mm x 5 mm avec un scalpel, en s'aidant éventuellement d'une pince	Mettre cet échantillon dans un tube de 5 ml dans lequel se fera la coloration

Conserver le reste de l'échantillon dans son tube original avec la solution d'éthanol 70% (pour une éventuelle utilisation ultérieure).

5.1. Réhydratation



Éthanol 50% :
15 min à température ambiante



Eau déminéralisée :
15 min à température ambiante

5.2. Coloration

Bleu d'alcian :

5 min (ou plus selon l'échantillon), à température ambiante

Eau déminéralisée

3 rinçages avec de l'eau déminéralisée (3 x 3 min) pour bien éliminer l'excès de colorant



Acide périodique 1 %

5 min à température ambiante

Eau déminéralisée

3 rinçages avec de l'eau déminéralisée (3 x 3 min)

Réactif de Schiff

5 min (ou plus selon l'échantillon) à température ambiante

Eau déminéralisée

3 rinçages à l'eau déminéralisée (3 x 3 min)

Acide acétique 45%.

Milieu final

5.3. Conservation de l'échantillon coloré

Conserver à 4°C dans l'acide acétique 45% (5 jours maximum)

5.4. Dissection des villosités

Préparation de l'échantillon à disséquer

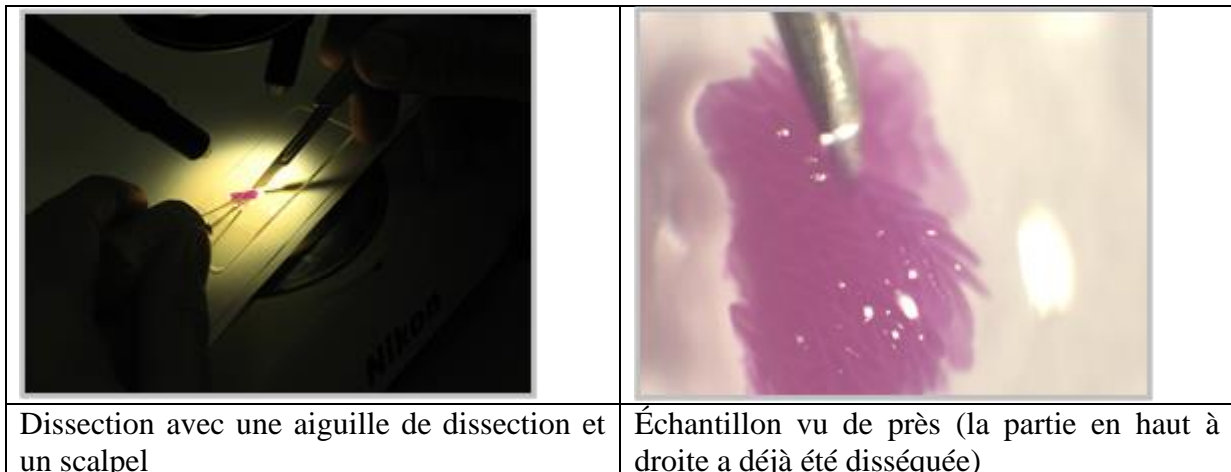
Déposer l'échantillon coloré sur une boîte de pétri (séreuse côté boîte et muqueuse côté manipulateur), et ajouter sur l'échantillon de l'acide acétique avec une pipette Pasteur (pour éviter son dessèchement)

Couper un segment plat de 4 mm x 4 mm avec un scalpel, en s'aidant éventuellement d'une pince, et le déposer sur une lame numérotée

Rajouter quelques gouttes d'acide acétique sur l'échantillon pour éviter son dessèchement

Dissections des villosités

Sous l'objectif du microscope à dissection (avec un éclairage avec une source de lumière froide), disséquer les villosités une à une soigneusement à l'aide d'une aiguille de dissection et d'un scalpel, en séparant bien les villosités jusqu'à leur base pour entraîner leurs cryptes sans les détériorer lors de la dissection



Disséquer environ 30 à 40 villosités dans l'objectif ultérieur, lors des prises de vue, de sélectionner 15 villosités de taille représentative de l'échantillon, avec leurs cryptes.

5.5. Montage de la lame

Enlever l'excès d'acide acétique par capillarité à l'aide d'un papier absorbant

Pour fixer chaque villosité avec ses cryptes sur la lame, ajouter 2-3 gouttes du liquide de montage Aquatex (Merck) et couvrir avec une lamelle.

Border hermétiquement la lame (ajouter du vernis à ongle incolore autour de la lamelle pour assurer l'étanchéité) même pour une conservation de quelques jours (pour empêcher l'évaporation de l'acide acétique)

Laisser sécher une nuit à température ambiante

La lame peut se conserver plusieurs années à température ambiante.

5.6. Prise d'images

Observer l'ensemble des villosités disséquées sur la lame, et repérer le type de villosités (petites, moyennes, grandes ...)

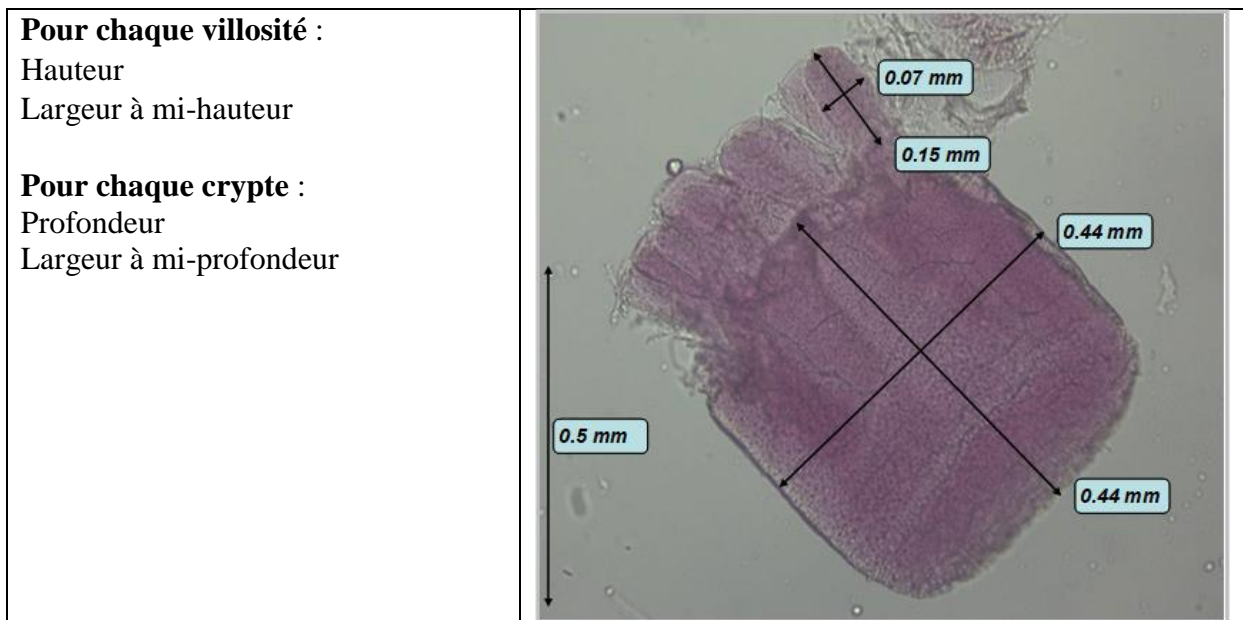
Sélectionner 15 villosités de taille représentative de l'ensemble des villosités disséquées, en fonction de l'objectif ciblé (voir partie « Principe »).

Prendre une photo pour chaque villosité, et au moins 10 villosités par animal et segment digestif étudié.

5.7. Traitement des images

Pour chaque villosité, mesurer 2 cryptes ou plus, soit au moins 20 cryptes par animal et segment digestif étudié

Avec le logiciel d'analyse d'image, mesurer :



Concernant les surfaces, elles peuvent soit être mesurées si le logiciel d'analyse d'image le permet, soit être calculées (voir en-dessous).

5.8. Calculs

Surfaces des villosités

Elles peuvent être calculées à partir de la largeur et de la hauteur des villosités (ou de la profondeur pour les cryptes)

Ratios des différentes structures intestinales :

Plusieurs ratios peuvent être calculés :

Hauteur/Largeur pour les villosités

Profondeur/Largeur pour les cryptes

Hauteur Villosité / Profondeur Crypte

Moyenne des valeurs pour chaque animal et variation des valeurs

Les valeurs moyennes des 10 villosités et 20 cryptes par animal pour chaque type de segment intestinal apportent une information sur la surface d'absorption (villosité) et de prolifération cellulaire (crypte).

Le calcul de la variation de taille de ces structures intestinales permet d'avoir une estimation de l'hétérogénéité intra-individuelle, ce qui peut traduire un dysfonctionnement de celles-ci.

6. HYGIÈNE ET SÉCURITÉ

Pour l'étape de microdissection des villosités, faire des pauses fréquentes pour éviter la fatigue visuelle liée à l'observation avec le stéréoscope.

7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brunsgaard, G. (1995). Intestinal morphology, epithelial proliferation and nutrient digestibility in rats as influenced by indigestible polysaccharides and period of adaptation. Danish Institute of Animal Science, Department of Nutrition, Research Centre Foulum et Research Department of Human Nutrition, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, DK.
- 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.
- Henning, S. J. (1979). Biochemistry of intestinal development. *Environ Health Perspect.*, 33, 9-16.
- Meddings, J. B., Theisen, S. (1989). Development of rat jejunum: lipid permeability, physical properties, and chemical composition. *American Journal of Physiology*, 256(5 Pt 1), G931-940.
- Perry, R. W., Rowland, G. N., Glisson, J. R. (1991). Poultry malabsorption syndrome. I. Malabsorption in poultry enteritis. *Avian Diseases*, 35(4), 685-693.

8. ANNEXE

Protocole « Prélèvement des tissus intestinaux chez les oiseaux d'élevage pour analyse histologique par microdissection »