



HAL
open science

Mode opératoire : Prélèvement de tissus intestinaux d'oiseaux d'élevage et préparation d'extrait de ces tissus pour le dosage d'activités enzymatiques des muqueuses

Irène Gabriel

► **To cite this version:**

Irène Gabriel. Mode opératoire : Prélèvement de tissus intestinaux d'oiseaux d'élevage et préparation d'extrait de ces tissus pour le dosage d'activités enzymatiques des muqueuses. 2015. <hal-03794860>

HAL Id: hal-03794860

<https://hal.inrae.fr/hal-03794860v1>

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 d'oiseaux d'élevage
et préparation d'extrait de ces tissus
pour le dosage d'activités enzymatiques des muqueuses

Date d'émission : 2015

Rédaction : Maryse Leconte, Serge Mallet

Revu par : Irène Gabriel

Version : n°1

Diffusion : Personnels de laboratoires étudiant la physiologie digestive des volailles

Mots clés : Muqueuses digestives, Activités enzymatiques, Volailles

SOMMAIRE

- 1 Objet - Domaine d'application**
- 2 Principe**
- 3 Réactifs**
- 4 Appareillage**
- 5 Mode opératoire**
- 6 Hygiène et sécurité**
- 7 Référence**
- 8 Annexe**

1. Objet - Domaine d'application

Réalisation de prélèvements de sections de tissus intestinaux (intestin grêle) et préparation d'un extrait de ces tissus en vue du dosage des protéines et des activités enzymatiques dans ces tissus.

2. Principe

Les tissus sont prélevés sur animaux, puis débarrassés de tout contenu digestif, et conservés à -70°C jusqu'à leur utilisation. La préparation de l'extrait consiste à homogénéiser le tissu pour mettre en suspension les protéines en vue de leur quantification ou du dosage d'activité enzymatique.

Pour effectuer cette extraction, différents milieux peuvent être utilisés. Dans le cas des activités enzymatiques, l'extraction s'effectue avec un tampon salin permettant la conservation de ces activités. Pour la détermination de la concentration en protéines, l'extraction peut s'effectuer soit avec un détergent permettant une extraction optimale des protéines, soit avec le même tampon salin que celui utilisé pour les activités enzymatiques. Cette dernière méthode permet d'effectuer les deux types de déterminations sur le même extrait, ainsi que de limiter les manipulations et le nombre d'échantillons à conserver. Cependant, elle ne permet pas une extraction totale.

La méthode d'extraction des protéines (et donc des enzymes) avec un tampon salin a été utilisée par Gabriel et al (2003) et Williams et al (2008).

3. Réactifs et petits matériels

3.1. Réactifs

Pour les prélèvements

- NaCl (Sigma)
- Détergent polyvalent pour le nettoyage du matériel chirurgical et la tige de l'homogénéiseur après l'ensemble des broyages (Ex : RBS ®)
- Ethanol 70% pour le matériel chirurgical
- Glace pilée

Pour l'extraction des tissus

- Dodecylsulfate de sodium (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (Sigma) ou solution à 1% (Sigma)
- Tablette de Tampon phosphate salin (phosphate buffered saline pour PBS : Sigma P 4417, 10 mM Tp P, 27 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4 à 25°C)
- Glace pilée
- Azote liquide

3.2. Petit matériel

Matériel de dissection

- Gros ciseaux (Ouverture de l'animal, prélèvement du segment intestinal)
- Ciseaux fin (Prélèvement du segment de tissus intestinal puis coupure longitudinale du segment)
- Pince à dissection pour tenir l'échantillon au moment des rinçages
- Plateau de prélèvement (ex : 20 cm x 20 cm) pour l'appareil digestif avec un système de refroidissement avec de la glace sans congeler les tissus

Matériel de laboratoire

- Pour chaque échantillon :
- Boîte de pétri pour chaque segment digestif (avec un système de refroidissement avec de la glace sans congeler les tissus)
- Cryotubes pour congélation des échantillons dans l'azote liquide (ex : Microfuges Eppendorf® 1.5 ou 2 ml ou tube de 8 ml)
- 1 tube* à fond rond pour l'homogénéisation de l'échantillon (Volume à adapter en fonction de la quantité d'échantillon (3.5 à 5 ml ou 20 ml ; voir paragraphe 5.3.1.)
* Centrifugeables si possible pour éviter un transfert d'échantillon (Ex : Tube de 13 ml en polypropylène pour des volumes d'extraction de 1.5 à 8 ml ; fournisseur : Starstedt)
- Eventuellement des tubes pour la centrifugation (10 000 g)

- Tubes (3) pour rincer la tige de l'homogénéiseur

- Matériel /Verrerie de laboratoire :
- Bêchers, spatules ...
- Pipette monocanal de 5 ml

Papier absorbant (bien absorbant)

4. Appareillage

- Homogénéiseur d'échantillon (IKA Ultra-Turrax™, T25 basic)
Puissance du moteur débitée : 300 Watt ; Choix de 6 vitesses de 11 000 à 24 000 t / min
Tige dispersante de 8 mm de diamètre (ref : S25N-8G)

- Centrifugeuse à température ambiante et réfrigérante (4°C), vitesse 10 000 g

- Balance à 0,01 g

5. Mode opératoire

5.1. Préparation des solutions

A préparer avec de l'eau déminéralisée

Liquide physiologique pour les prélèvements

- Solution de NaCl (liquide physiologique)
Dissoudre 9 g/l
Prévoir environ 40 ml / échantillon (on peut réduire à 25 ml)
Conserver à 4°C une semaine maximum (maintenir à 4°C pendant les prélèvements)

Réactifs pour l'extraction

Rq : quantité variable selon les conditions (voir partie 5.3.1. et 5.3.2. ; entre 2 et 5 ml par échantillon)

- Dodecylsulfate de sodium (SDS) : solution à 1%
À peser avec un masque et solubiliser dans de l'eau déminéralisée ou utiliser une solution commerciale
Conserver à température ambiante
- Solution de PBS
1 pastille / 200 ml d'eau déminéralisée
Conserver à 4°C (pendant 1 semaine maximum)

5.2. Prélèvement des échantillons

5.2.1. Mise à mort des animaux

Elle peut s'effectuer avec du CO₂ en bouteille avec un dispositif hermétique approprié ou par injection de pentobarbital de sodium en intraveineuse ou au niveau du sinus occipital (Directive 2010/63/UE 2010).

5.2.2. Ouverture de l'animal et prélèvement du segment intestinal

Le temps entre la mort de l'animal et la prise de l'échantillon doit être le plus court possible (10 min maximum) du fait de la rapide dégradation des tissus. De même les différents rinçages avant congélation doivent être effectués rapidement.

A l'aide de gros ciseaux, ouvrir la cavité abdominale de l'animal, retirer l'appareil digestif, et le placer sur un plateau avec un système de refroidissement avec de la glace sans congeler les tissus.

5.2.3. Prélèvements

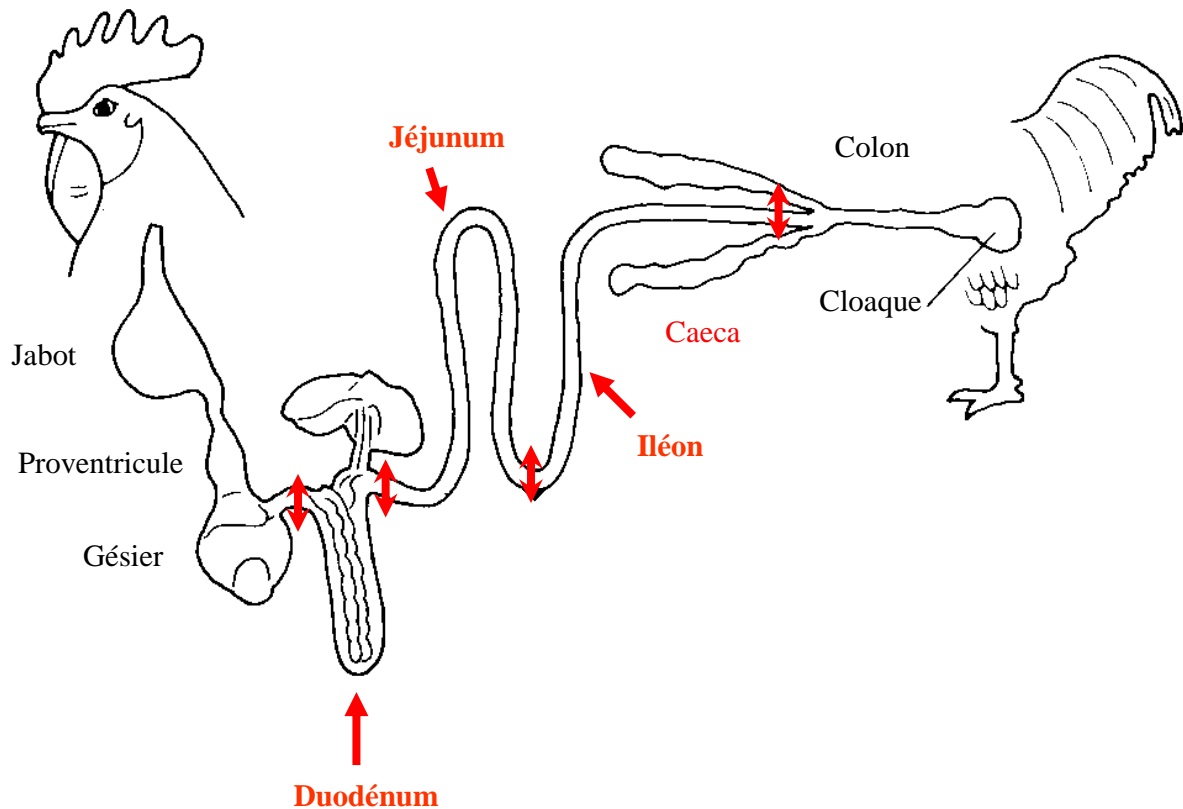


Figure : Schéma de l'appareil digestif d'un poulet et des différents segments intestinaux

5.2.3.1. Prélèvement d'une partie des segments digestifs

Isoler le ou les segments digestifs d'intérêt (Duodénum, jéjunum ou iléon), puis détacher le méésentère avec les doigts le plus proche possible de la paroi de chaque segment, ainsi que les éléments de graisse

Pour chaque segment intestinal d'intérêt, prélever le 1/3 médian et le maintenir au froid dans une boîte de pétri posée sur de la glace

Rq : Si l'objectif est d'exprimer l'activité enzymatique par unité de poids de l'animal ce qui permet d'effectuer un lien entre un paramètre digestif (activité enzymatique) et un résultat zootechnique (poids corporel), le poids entier (et non pas seulement 1/3) de chaque segment intestinal vidé doit être déterminé

5.2.3.2. Découpe du segment digestif longitudinalement

A l'aide de ciseaux fin

5.2.3.3. Nettoyage de l'échantillon prélevé

Eliminer les contenus digestifs avec le liquide physiologique maintenu à 4°C pendant les prélèvements

- Prendre le morceau d'intestin avec une pince de dissection
- Eliminer la plus grande quantité de contenus digestifs en secouant le morceau d'intestin dans un bécher contenant du liquide physiologique à 4°C (Renouveler le contenu de ce bécher pour chaque échantillon)
- Eliminer le reste de contenus digestifs adhérents par 3 lavages successifs dans 3 autres béchers

Rq : En moyenne, changer le liquide physiologique de ces 3 béchers tous les 6 échantillons (Renouveler plus fréquemment en cas de grandes quantités de contenu digestif)

- Elimination de l'excédent de liquide physiologique

Tamponner très légèrement le tissu sur du papier absorbant pour minimiser la quantité restante de liquide physiologique (éviter une dilution de l'échantillon de tissus) sans dégrader la muqueuse (entérocytes avec activité enzymatique)

Rq : L'échantillon peut aussi s'obtenir par **raclage de la muqueuse**, ce qui présente 2 avantages. D'une part, l'objectif étant d'étudier les activités enzymatiques de l'épithélium digestif, ceci permet d'éviter d'avoir les autres composants de l'intestin et leurs potentielles activités enzymatiques. D'autre part, ceci permet d'utiliser ultérieurement un aliquote de tissu (après homogénéisation) et non pas l'ensemble.

Pour ce faire, il faut racler la muqueuse de façon standardisée puis homogénéiser l'échantillon, avant répartition dans les tubes de stockage.

5.2.3.4. Conservation de l'échantillon

Transférer l'échantillon dans un ou plusieurs cryotubes de 1.5 ou 2 ml ou tube de 8 ml et le congeler dans l'azote liquide

Conserver à -70°C (ou -20°C si les dosages sont effectués rapidement du fait de la baisse de l'activité enzymatique au cours du stockage à cette température)

5.3. Préparation de l'extrait

Selon l'objectif, dosage des protéines ou dosage des activités enzymatiques, la solution d'extraction est soit du SDS, soit du PBS respectivement. Comme indiqué précédemment dans la partie « principe », le dosage des protéines peut aussi s'effectuer dans l'extrait avec du PBS effectué pour les activités enzymatiques, avec les avantages et inconvénients indiqués précédemment.

5.3.1. Pesée de l'échantillon et dilution

Dans un tube à fond rond de 3.5 à 5 ml voir plus (20 ml), **peser l'échantillon** disponible et **noter la quantité utilisée** *

* Si possible **entre 1 g et 5 g** d'échantillon (il est préférable d'utiliser une quantité importante et donc plus représentative du segment digestif étudié)

Dans le cas d'échantillons de poids inférieur à 1 g (ex : jeunes animaux comme des poussins de 7 jours), utiliser l'ensemble des tissus disponibles, et adopter un ratio « solution d'extraction / tissu » différent de celui utilisé pour des échantillons de plus d'1 g de façon à avoir au moins 2 ml de solution pour l'homogénéisation. Les résultats de dosage de ce type d'échantillons ne pourront pas être comparés directement avec ceux effectués avec un ratio « solution d'extraction / tissu » plus faible.

Pour des séries d'échantillons de quantité non connue, pour déterminer le ratio « solution d'extraction / tissu », peser au préalable la quantité disponible pour l'ensemble des échantillons (sans décongélant, vider le tube sur une feuille d'aluminium).

Rq : Pour les prélèvements de tissus intestinal entier (au lieu de raclages de la muqueuse), pour ne prélever qu'un aliquote de tissus et non pas l'ensemble, pour utiliser des volumes d'extraction plus faible, il est possible de **broyer l'échantillon avec de l'azote liquide** avant la prise d'échantillon. Lors de la prise d'échantillon en poudre, utiliser une spatule refroidie par de l'azote liquide. Cette méthode présente cependant **l'inconvénient de rajouter une étape qui est relativement longue**.

5.3.2. Homogénéisation de l'échantillon

Ajouter le volume nécessaire de solution d'extraction avec un rapport de **5 ml / g* de tissu** et **noter la valeur** du volume réellement utilisé.

* Le volume peut être réduit (ex : 2 ml / g de tissu) si les échantillons sont peu concentrés

Broyer l'échantillon avec la tige de l'homogénéiseur pendant 3 fois 10 sec à 24 000 t / min (10 sec de repos entre chaque broyage)

Pour l'extraction des protéines* : avec le SDS, à température ambiante

Pour l'extraction des enzymes : avec le PBS, dans la glace

* Peut aussi être effectuée avec le PBS (voir la partie « Principe »)

Nettoyer l'extrémité de la tige de l'homogénéiseur entre chaque échantillon :

- Eliminer les éventuelles particules de tissus présentes
- Rincer l'extrémité de la tige dans 3 tubes différents contenant un solvant permettant l'élimination des restes de substances présentes, mais n'abimant pas les joints (solution aux mêmes propriétés que le solvant utilisé pour homogénéiser les échantillons), rincer à l'eau déminéralisée, et tamponner avec du papier absorbant pour éliminer l'eau résiduelle, avant le broyage de l'échantillon suivant.

Après l'ensemble des broyages, démonter la tige et la nettoyer avec un détergent selon la description du fournisseur

5.3.3. Récupération de l'extrait de tissus

Transférer la suspension dans des tubes permettant leur centrifugation

Centrifuger à 10 000 g, 15 min

Pour l'extraction avec le SDS (pour le dosage des protéines) : à température ambiante

Pour l'extraction avec le PBS (pour les dosages enzymatiques ± protéines) : à 4°C

Récupérer le surnageant* et faire des aliquotes (ex : 200 µl) dans plusieurs tubes** de 1 ml (conservable à -70°C ou -20°C si le dosage est effectué rapidement (1-2 mois))

* S'il y a des graisses au-dessus de l'extrait, pipetter l'extrait sous la couche de graisse

** Prévoir autant de tubes que d'analyses à effectuer pour ne pas décongeler l'ensemble de l'extrait pour chaque dosage ; Pour des extractions à 2 ml / g, pour la PA (50 µl), pour la LAP (150 µl), pour la maltase (250 µl) ; Prévoir aussi des tubes pour des essais pour la recherche de la dilution à effectuer pour les dosages ;

6. Hygiène et sécurité

6.1. Utilisation des réactifs

Tous les travaux doivent être effectués avec une blouse et des gants.

Utiliser un masque pour la pesée du SDS (R22, R36/38, S22-26-36)

Phrases de risques

R22 : Nocif en cas d'ingestion

R36/38 : Irritant pour les yeux et pour la peau

Conseil de prudence

S22 : Ne pas respirer les poussières

S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste

S36 : Porter un vêtement de protection approprié

Alternative :

Utiliser une solution commerciale prête à l'emploi

6.2. Elimination des produits

Les produits sont à éliminer dans des containers pour déchets chimiques.

7. Référence

Méthode de mise à mort des animaux

Directive 2010/63/UE. 2010. Directive relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Journal Officiel de l'Union Européenne:33-79.

Méthode de prélèvement et extraction des tissus intestinaux

Gabriel I, Mallet S, Leconte M. 2003. Differences in the digestive tract characteristics of broiler chickens fed on complete pelleted diet or whole wheat added to pelleted protein concentrate. *British Poultry Science* 44:283-290.

Williams J, Mallet S, Leconte M, Lessire M, Gabriel I. 2008. The effects of fructo-oligosaccharides or whole wheat on the performance and the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science* 49:329-339.

8. Annexe

Protocole de dosage enzymatique des muqueuses (Phosphatase alcaline, leucine aminopeptidase, maltase) et des protéines