



HAL
open science

Mode opératoire : Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline dans la muqueuse intestinale d'oiseaux d'élevage

Irène Gabriel

► To cite this version:

Irène Gabriel. Mode opératoire : Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline dans la muqueuse intestinale d'oiseaux d'élevage. 2015. hal-03794871

HAL Id: hal-03794871

<https://hal.inrae.fr/hal-03794871>

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.

Mode opératoire
Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline
dans la muqueuse intestinale
d'oiseaux d'élevage

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, Activité enzymatique, Phosphatase alcaline, Oiseaux d'élevage

SOMMAIRE

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

1. Objet - Domaine d'application

Le but de cette procédure est de doser la phosphatase alcaline (PA) dans des extraits de muqueuse intestinale de poulet ou d'autres oiseaux d'élevage.

Cette enzyme s'exprime dans la membrane des entérocytes matures des villosités intestinales, et son activité est maximale en haut des villosités (Weiser, 1973; Bikle et al., 1977; Traber et al., 1991). Dans l'intestin du poulet, elle a une activité, exprimée par g de tissus, maximale dans le duodénum, plus faible dans le jéjunum, et très faible dans l'iléon (Gabriel et al, 2003 ; Williams et al, 2008). Lorsqu'elle est exprimée par g de poids de l'animal, elle est maximale dans le jéjunum, plus faible dans le duodénum, et toujours minimale dans l'iléon (Gabriel et al, 2003).

Elle est considérée comme un critère de maturité des entérocytes. Par ailleurs, elle possède de nombreuses activités (hydrolase, isomérase, transférase) et a un rôle majeur dans la santé digestive du fait de son intervention dans l'homéostasie et la protection intestinale (Vaishnava et Hooper, 2007 ; Lalles 2010, 2014). Parmi ses nombreuses activités biologiques, elle intervient dans l'hydrolyse et l'absorption de différents composants, la déphosphorylation des lipopolisaccharides bactériens (réduisant leur toxicité) et la réduction de l'inflammation intestinale (Lalles, 2010). Elle favorise la croissance des bactéries commensales (Malo et al, 2014).

Cette enzyme a aussi une forte activité dans les contenus digestifs du fait de la libération de vésicules riches en cette enzyme issues des microvillosités des entérocytes (Lalles et al, 2012 ; Shifrin et al, 2012).

2. Principe du dosage enzymatique

Du fait de l'intérêt en santé humaine de la PA (EC 3.1.3.1), de nombreuses méthodes de dosage ont été développées depuis les années 1930. Elle est évaluée par un dosage colorimétrique. Différents substrats artificiels de cette enzyme ont été utilisés pour mesurer son activité (King et Armstrong, 1934). Ici nous présentons une méthode utilisant le p-nitrophényl phosphate en milieu alcalin (Bessey et al, 1946). Le substrat est hydrolysé en p-nitrophénol et phosphate. L'apparition du p-nitrophénol, est suivie par son absorbance à 405 nm (couleur jaune) en milieu alcalin, qui est proportionnelle à l'activité de la PA de l'échantillon. Ce dosage s'effectue en présence de magnésium qui est essentiel pour la stabilité et une activité maximale de l'enzyme étudiée (Cathala et Brunel, 1975). La méthode initialement développée pour le dosage de la PA dans le sérum a été adaptée pour une application à des extraits de muqueuses intestinales (Hoste and Mallet, 1990). Elle s'effectue en tube à l'aide d'un spectrophotomètre avec une mesure à 2 temps (Walter et Schutt, 1974 ; Hoste et Mallet, 1990 ; Gabriel et al, 2003). Dans le protocole présenté ici, il a été adapté pour une micro méthode dans des plaques de 96 puits (Gabriel et al 2003). Pour augmenter la précision, au lieu d'une méthode à 2 temps, une mesure en cinétique peut être effectuée (Bowers et McComb, 1966 ; Williams et al, 2008). Cette mesure en cinétique peut aussi s'adapter en tube à l'aide d'un spectrophotomètre. Le dosage de cette enzyme s'effectue aussi couramment dans les laboratoires d'analyse médicale à l'aide d'automate.

3. Réactifs et petits matériels

3.1. Réactifs

- Pastille 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)

- Glycine (Sigma G 7126)

- MgCl₂, 6 H₂O* (Sigma M 2670 ; 203.3 g/mol)

- NaOH 1N ou 10 N

* Ce produit est hygroscopique ; Vérifier son état avant utilisation

- Substrat : p-nitrophényl phosphate (disodique, hexahydrate) (Sigma N 4645 ; 371.1 g/mol)
Conservation à -20°C

- Produit de la réaction : p-nitrophénol (4-nitrophenol) (Sigma N 7660 ; 10 mM)
Conservation à 4°C

3.2. Petit matériel

- Pour chaque échantillon :
Microtubes de 0.5 ou 1.5 ml pour la(es) dilution(s)

- Pour la gamme
Tube de 2-3 ml pour la solution de départ, et microtubes de 0.5 ou 1.5 ml pour les différents points de la gamme

- Pipettes mono et multicanaux et cônes adaptés*, Multipette ® et Combitips ®, gouttière pour une distribution rapide de volumes identiques

* Dans portoir à cônes pour les pipettes multicanaux

- Matériel /Verrerie de laboratoire (bêchers, spatules, fioles jaugées, ...)

- Plaque 96 puits à fond plat (volume total de 350 µl ; pour 300 µl de réactif)

- Glace pilée pour les dilutions

4. Appareillage

- Balance de précision à 0.01 g pour les différents constituants du tampon

- Balance de précision à 0.1 mg pour le substrat

- pH mètre

- Lecteur de plaque 96 puits, thermostaté (39°C) et mesure en cinétique pour une lecture de densité optique à 405 nm** (Tecan ®, modèle Infinite M200)

* Si le lecteur n'est pas thermostaté, utiliser une étuve à 39°C (ou 37°C) située à proximité du lecteur de plaque

** Si le lecteur à des filtres de longueur d'onde fixe, choisir le plus proche du maximum d'absorption (405 nm)

- Étuve 39°C (voire 37°C) (pour la solution de substrat)

5. Mode opératoire

5.1. Préparation des solutions tampon

- **Tampon PBS** KCl NaCl 10 mM

Dissoudre une pastille dans 200 ml d'eau déminéralisée
Conservation une semaine à 4°C

- **Tampon glycine** 0.93 M, MgCl_2 50 mM pH 8.8

Conservation une semaine à 4°C

Réactif	Pour 50 ml (2 plaques) (1)
Glycine (75 g/mol)	3.5 g
$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ (203.3 g/mol)	0.51 g
Eau	35 ml
Ajuster à pH 8.8	avec environ 5 à 7 ml de NaOH 1N
Compléter avec de l'eau déminéralisée	à 50 ml

(1) Une plaque de 96 puits correspond à 6 points de la gamme en double (2.4 ml de tampon glycine seul) et 27 échantillons en triple avec un témoin 'substrat' en triple (16.8 ml de tampon avec substrat), soit 20 ml ; avec une marge de sécurité à cause du volume perdu avec la gouttière utilisée pour le pipetage avec la pipette multicanaux

5.2. Dilution de l'extrait de muqueuse

Les extraits de muqueuse conservés à -70°C doivent être mis à température ambiante pendant environ 20 minutes, pour être décongelés.

Maintenir tous les tubes à 0-4°C dans de la glace pilée

Choix de la dilution à réaliser

Pour pouvoir comparer différents échantillons entre eux, la même dilution doit être réalisée.

Exemple :

Un extrait de muqueuse à 1 g / 2 ml dans du tampon PBS, avec une dilution de 1/200 pour des échantillons de duodénum et jéjunum et 1/100 pour des échantillons d'iléon, donne des valeurs de densité optique appropriées pour des poulets à croissance rapide de 3 semaines (Williams et al, 2008).

Un extrait de muqueuse à 1 g / 5 ml dans du tampon PBS, avec une dilution de 1/20 pour des échantillons d'iléon distal, donne des valeurs de densité optique appropriées pour des poulets à croissance intermédiaire (Lignées D+D-, URA, 2015).

Des essais sont nécessaires pour adapter la dilution aux échantillons à analyser, ainsi que la durée du temps de lecture de la densité optique.

L'**activité enzymatique** mesurée doit **rester linéaire** dans les conditions définies pour le dosage. Pour cela, il est nécessaire de vérifier (en même temps que le contrôle de la gamme, cf 5.4) la linéarité du dosage. Pour ce faire, on réalise un dosage sur une durée de **75 minutes** pour des **échantillons représentatifs** des extraits à analyser (Ex : tissus de duodénum, jéjunum,

iléon et les différents traitements étudiés) à plusieurs dilutions de part et d'autre de celles indiquées ci-dessus (Ex : 1/10, 1/20, 1/40 pour des iléons distaux extraits à 1 g / 5 ml). On note alors la valeur de DO à partir de laquelle un plateau est atteint. Cette valeur est considérée comme la limite de linéarité de la méthode. Sélectionner alors la concentration permettant d'avoir une **réponse linéaire** sur la gamme maximum de DO utilisable, tout en privilégiant un temps de réaction compatible avec la précision recherchée (si 45 min suffisent, ne pas le faire sur 75 min)

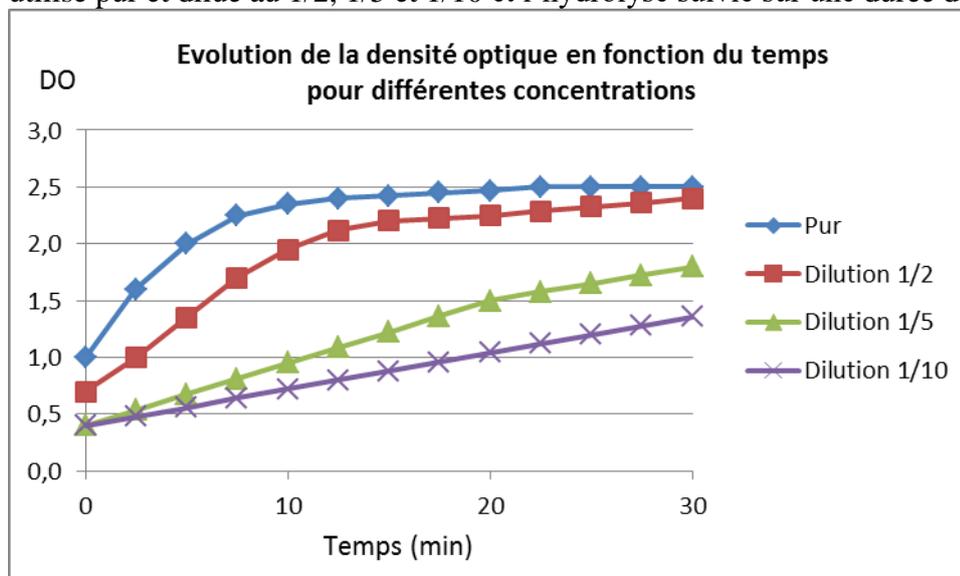
Réalisation des dilutions pour la recherche de la dilution optimale

Les dilutions sont effectuées dans du PBS à l'aide d'une pipette standard afin de permettre, par plusieurs mouvements d'aspiration/ rejet, une homogénéisation correcte.

Effectuer les dilutions dans des microtubes de 0.5 ou 1.5 ml dans de la glace pilée

N° de dilution	Dilution	Tp PBS	Extrait ou dilution
1	1/10	450 µl	50 µl d'extrait
2	1/20	250 µl	250 µl de dilution 1/10
3	1/40	250 µl	250 µl de dilution 1/20

Exemple de recherche de la dilution optimale et du temps optimal avec un échantillon d'essai, utilisé pur et dilué au 1/2, 1/5 et 1/10 et l'hydrolyse suivie sur une durée de trente minutes



Un plateau apparaît à partir de 2 unités de DO. Cette valeur peut donc être considérée comme la limite de linéarité de la méthode. Ce plateau est atteint après seulement 5 mn avec l'échantillon pur, 10 mn pour l'échantillon dilué au 1/2 et n'est jamais atteint pour l'échantillon dilué au 1/10. Au cours des 15 premières minutes, la réaction est bien linéaire pour les échantillons dilués au 1/5 et 1/10. Ceci permet d'utiliser pour les dosages ultérieurs d'échantillons comparables à ces dilutions, une durée de réaction de **15 mn**.

A partir de ces courbes, on calcule la pente ($\Delta DO/h$) de la partie linéaire.

Réalisation des dilutions une fois la dilution optimale déterminée :

Si le dosage est effectué en microplaque de 96 puits, les dilutions sont réalisées dans des tubes de 3,5 ml disposés dans un portoir à cônes suivant le plan de plaque établi. Cette disposition permet ensuite d'utiliser une pipette multicanaux pour distribuer les échantillons sur la plaque. Les dilutions sont effectuées dans du PBS à l'aide d'une pipette standard afin de permettre, par plusieurs mouvements d'aspiration/ rejet, une homogénéisation correcte.

Maintenir les échantillons et dilutions dans la glace pilée au cours des dilutions

Disposition des échantillons dans un portoir à cônes pour le dépôt ultérieur sur la plaque 96 puits

Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4
Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8
Ech 9	Ech 10	Ech 11	Ech 12
Ech 13	Ech 14	Ech 15	Ech 16
Ech 17	Ech 18	Ech 19	Ech 20
Ech 21	Ech 22	Ech 23	Ech 24
Ech 25	Ech 26	Ech 27	Ech Ts*

* **Témoin 'substrat'** avec 100 µl de tampon PBS

Pour tenir compte de l'évolution du substrat dans les conditions du dosage

5.3. Préparation de la gamme étalon avec le produit de la réaction enzymatique

p-nitrophénol dilué dans du PBS (comme l'extrait de muqueuse)

a. Pour de petites quantités de gamme

Dilution de la solution du commerce (10 mM) au 1/30 : 50 µl + 1 450 µl de PBS

Dilutions de la gamme

b. Pour de nombreux dosages (32 gammes au total)

Dilution de la solution du commerce (10 mM) au 1/30 : 833 µl + 25 ml de PBS

Dilutions de la gamme :

n° tube	Dilution	Concentration (µM)	Solution au 1/30 (µl)	PBS (µl)
1	0	0	-	500
2	0.2	66.6	100	400
3	0.4	133.2	200	300
4	0.6	200	300	200
5	0.8	266.4	400	100
6*	1	333	500	-

* Conduit à une DO_{405 nm} d'environ 1.8

n° tube	Dilution	Solution au 1/30 (ml)	PBS (ml)
1	0	-	8.0
2	0.2	1.6	6.4
3	0.4	3.2	4.8
4	0.6	4.8	3.2
5	0.8	6.4	1.6
6	1	8.0	-

Vérifier la gamme sur une plaque 96 puits

Faire des aliquotes de 500 µl pour chaque point de gamme (16 tubes de chaque point) (conservation à -20°C)

5.4. Préparation du substrat artificiel de la réaction enzymatique

p-nitrophényl phosphate (8.8 µmol / ml de Tp glycine)

Pour une plaque (27 échantillons en triple + Témoin 'substrat' en triple : 16.8 ml) :

- Peser 65.3 mg de substrat sur un papier
- Dissoudre dans du Tp glycine
- Compléter à 20 ml

5.5. Réaction colorimétrique

Plan de plaque (96 puits)

Exemple en remplissant la plaque entière avec les 6 points de la gamme en double et 28 échantillons en triple

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gamme 1		Gamme 2		Gamme 3		Gamme 4		Gamme 5		Gamme 6	
B	Ech 1		Ech 2		Ech 3		Ech 4		Ech 5		Ech 6	
C	Ech 7		Ech 8		Ech 9		Ech 10		Ech 11		Ech 12	
D	Ech 13		Ech 14		Ech 15		Ech 16		Ech 17		Ech 18	
E	Ech 19		Ech 20		Ech 21		Ech 22		Ech 23		Ech 24	
F	Ech 25		Ech 26		Ech 27		Ech 28		Ech 29		Ech 30	
G	Ech 31		Ech 32		Ech 33		Ech 34		Ech 35		Ech 36	
H	Ech 37		Ech 38		Ech 39		Ech 40		Ech 41		Ech Ts*	

* Témoin 'substrat' avec 100 µl de tampon PBS

Pour tenir compte de l'évolution du substrat dans les conditions du dosage

Remplissage de la plaque de 96 puits

S'assurer que le lecteur de plaque est disponible avant de commencer de remplir la plaque
Mettre un papier noir sous la plaque pour faciliter le remplissage

- **Pour la gamme, déposer sur la plaque 96 puits** : point en double
- Mettre 100 µl des dilutions de la gamme
- Ajouter 200 µl de Tp Glycine

- **Pour les échantillons** : dépôt des échantillons en triple
- Mettre 100 µl d'extrait de muqueuse avec une pipette multicanal sur la plaque 96 puits à température ambiante*

* Suffisamment rapide pour qu'il n'y ait pas de dégradation notable des enzymes

Echantillons dans le portoir à cônes

Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4
Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8
Ech 9	Ech 10	Ech 11	Ech 12
Ech 13	Ech 14	Ech 15	Ech 16
Ech 17	Ech 18	Ech 19	Ech 20
Ech 21	Ech 22	Ech 23	Ech 24
Ech 25	Ech 26	Ech 27	Ech Ts*

* Témoin 'substrat' avec 100 µl de tampon PBS

Pour tenir compte de l'évolution du substrat dans les conditions du dosage

Remplissage en 1 à 2 min / plaque

- Ajouter 200 µl de substrat mis à l'étuve 39°C* avant distribution (15 min maximum**)

* Pour un démarrage plus rapide de la réaction (ou 37°C)

** Pour éviter une dégradation du substrat

Remplissage à partir de la gouttière (rapidement, 30 sec à 1 min / plaque)

Lecture de la plaque

Lecture en 2 temps avec un lecteur de plaque non thermostaté

Rq : Cette méthode est moins précise car tous les échantillons ne présentent pas la même courbe de cinétique du fait de leur concentration différente ; l'intervalle de temps est une moyenne

- Lecture à 405 nm (jaune) $T_{0 \text{ min}}$ *
- Mise à l'étuve à **39°C** pendant **30 min**
- Deuxième lecture à 405 nm $T_{30 \text{ min}}$ **

* Doit commencer après la phase de démarrage de la réaction (cinétique + lente que la zone linéaire) (au bout de 15 min)

** Doit s'arrêter avant la phase finale de la réaction (cinétique + lente que la zone linéaire)

Lecture en cinétique avec un lecteur de plaque thermostaté

Programmer le lecteur de plaque (cf mode d'emploi du lecteur de plaque)

Lecture de 0 à 75 min* à **39°C** toutes 45 sec à 405 nm

* Ce temps peut être réduit en fonction de la concentration des échantillons

5.6. Calculs et résultats

5.6.1. Mesure

Pour éliminer les éventuelles colorations parasites dues à l'échantillon, les mesures correspondent à une différence de DO

Comme indiqué précédemment, ce dosage peut s'effectuer avec une mesure à 2 temps, ou pour augmenter la précision, avec une cinétique.

La concentration (μM) est calculée d'après sa valeur dans les 100 μl de dépôt de gamme ou de la dilution de l'extrait de muqueuse

5.6.1.1. Mesure à 2 temps

L'activité se mesure par la pente de la droite d'apparition du produit de la réaction. On mesure donc la variation de DO entre $T_{0 \text{ min}}$ et $T_{30 \text{ min}}$

Var DO = $\text{DO}_{T_{30 \text{ min}}} - \text{DO}_{T_{0 \text{ min}}}$

Rapportée au 30 min de réaction, soit Var DO / 30 min, en pratique résultats en mDO / min

5.6.1.2. Mesure en cinétique

Réaliser avec le logiciel du lecteur de plaque 96 puits

Rq : Principe : Mesure de la pente maximale

Les courbes de cinétique sont sigmoïdes. L'objectif est de mesurer la vitesse au niveau de la zone linéaire centrale de la courbe. Selon les concentrations des échantillons, cette zone de pente maximale n'apparaît pas au même moment ; elle est plus précoce pour les échantillons les plus concentrés. Pour localiser cette pente maximale, les zones de plus faible vitesse au début et à la fin de la cinétique doivent être présentes dans les mesures. Le problème peut se poser pour les échantillons trop concentrés dont la partie finale plus lente de la cinétique peut

ne pas être visible ($DO > 3$) empêchant de savoir si la zone de vitesse maximale est incluse dans les mesures.

Mesure de la vitesse maximum dans la zone apparente de linéarité de la cinétique

Observer les courbes de cinétique

Pour l'ensemble des échantillons, noter l'intervalle de temps contenant la zone de linéarité encadrée par les zones de plus faible vitesse en amont et en aval (Ex : 5 à 75 min, pour une cinétique de 75 min)

Comparer les cinétiques des 3 répétitions de chaque échantillon pour visualiser une répétition aberrante

Dans la zone sélectionnée précédemment (5 à 75 min), calculer la pente de la courbe en **DO/h** (valeur chiffrée plus précise) sur plusieurs points (ex : 13 points, pour une mesure toutes les 45 sec pendant 10 min*) pour les différents intervalles de temps de la période de mesure (5-15 min, 15-25 min , ... 65-75 min)

* Des mesures sur des gammes de temps plus courtes conduisent à trop de fluctuations aléatoires

5.6.2. Calcul

1. Prendre en compte la réponse du substrat (Témoin « substrat »)*

* Lié à sa légère dégradation au cours de l'incubation à 39°C (ou 37°C)

Soustraire la valeur moyenne du Témoin substrat (moyenne des 3 mesures) à celle de chaque valeur de chaque échantillon pour la même gamme de temps

2. Sélectionner la vitesse maximale pour chaque échantillon

Pour les 3 répétitions de tous les échantillons, sélectionner la valeur maximale sur un temps de 10 min

Rq : La pente maximale ne se situe pas forcément dans le même intervalle de temps pour les différents échantillons

3. Faire la moyenne des 3 répétitions par échantillon

Eventuellement éliminer une valeur sur les 3, si elle est aberrante

4. Transformer la valeur initialement en DO/h en mDO/min

5. Calcul de l'activité enzymatique de l'échantillon dans l'extrait de muqueuse

5.1. Conversion de la valeur d'absorbance par unité de temps (mDO/min) en concentration par unité de temps ($\mu\text{M}/\text{min}$) à l'aide de la gamme étalon

Avec la **gamme**, déterminer la relation entre la densité optique (exprimé en mDO) et la concentration en produit de la réaction (exprimé en μM):

$$\text{Conc } (\mu\text{M}) = (a \cdot \text{mDO}) + b$$

Cette équation peut s'exprimer de la même façon **par unité de temps** :

$$\text{Var Conc } (\mu\text{M}/\text{min}) = a \cdot \text{Var DO } (\text{mDO}/\text{min})$$

→ V : Valeur en $\mu\text{M}/\text{min}$

5.2. Prise en compte de la dilution de l'extrait de tissus (Ex : 20 pour la PA)

Valeur dans l'extrait = V ($\mu\text{M}/\text{min}$) x Dilution

6. Expression par rapport à la quantité de protéines

Si les protéines et l'activité enzymatique ont été déterminées sur le même extrait dans du tampon PBS

Valeur de l'activité enzymatique dans l'extrait ($\mu\text{M}/\text{min}$) / Protéines (g/l) dans l'extrait
Exprimé en $\mu\text{ mole} / \text{min} / \text{g}$

Or 1 U = 1 μmol de p-nitrophényl phosphate hydrolysé / min (définition internationale)

D'où une expression en U / g de protéines ; c'est l'activité enzymatique spécifique.

7. Calcul de l'activité enzymatique par gramme de tissus

Tenir compte du volume d'extraction utilisé et de la quantité de tissus extrait

7.1. Prise en compte du volume d'extraction utilisé (Ex : 5 ml de tampon)

Quantité de produit = (V($\mu\text{M}/\text{min}$) x Dilution) x [Vol (ml) / 1000]

Le résultat est en $\mu\text{mol} / \text{min}$, soit en Unité d'activité enzymatique

7.2. Prise en compte de la quantité extraite de tissus (Ex : 1 g de tissus) et expression par unité de poids de tissus

[(V ($\mu\text{M}/\text{min}$) x Dilution) x [Vol (ml) / 1000]] / Poids tissus extrait (g)

Le résultat s'exprime en U / g de tissus

8. Expression par rapport à la quantité de protéines (Ex : 5% de protéines)

Si les protéines ont été extraites dans du SDS, et non pas du tampon PBS comme pour les activités enzymatiques (Sinon, voir le calcul précédent en 6.)

[(V ($\mu\text{M}/\text{min}$) x Dil*) x [Vol (ml) / 1000]] / [Poids tissus extrait (g) x [Prot(%) / 100]]

* Dilution

Avec Prot (%) : % de protéines dans le tissu

Le résultat s'exprime en U / g de protéines ; c'est l'activité enzymatique spécifique.

9. Expression par unité de poids de l'animal

Expression utilisée par des nutritionnistes comme Palo et al (1995), Mahagna et Nir (1996), King et al (2000) et Gabriel et al (2003). D'un point de vue de la biologie globale de l'animal, cette expression est plus intéressante, mais elle nécessite la mesure dans les 3 segments intestinaux, pour l'exprimer pour chacun des segments, ou l'ensemble des 3 segments.

[[(V ($\mu\text{M}/\text{min}$) x Dilution) x [Vol (ml) / 1000]] / Poids tissus extrait (g)] x [(Poids total Segment dig (g)) / Poids animal (g)]

Le résultat s'exprime en U / g de poids d'animal

6. Hygiène et sécurité

6.1. Utilisation des réactifs

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

6.2. Elimination des produits

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

7. Références bibliographiques

- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* ;164:321-9.
- Bikle DD, Empson RN, Herman RH, Morrissey RL, Zolock DR. 1977. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 on the distribution of alkaline phosphatase activity along the chick intestinal villus. *Biochim Biophys Acta* 499:61-66.
- Bowers GN, McComb RB. 1966. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin Chem*;12(2):70-89.
- Cathala G, Brunel C. 1975. Bovine kidney alkaline phosphatase. Catalytic properties, subunit interactions in the catalytic process, and mechanism of Mg²⁺ stimulation. *J Biol Chem* 250.
- 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.
- Hoste, H., Mallet, S., 1990. Effects of size of *Trichostrongylus colubriformis* infections on histopathology of the mucosa along the whole small intestine in rabbits. *Journal of Comparative Pathology* 103:457-465.
- King, D.E., Asem, E.K., Adeola, O., 2000. Ontogenetic development of intestinal digestive functions in White Pekin ducks. *Journal of Nutrition* 130, 57-62.
- King, E.J., Armstrong AR. 1934. A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Can Med Assoc J*;31:376-81.
- Lalles, J. P., 2010. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutrition Reviews* 68, 323-332.
- Lalles, J.P., Orozco-Solis, R., Bolanos-Jimenez, F., de Coppet, P., Le Drean, G., Segain, J.P., 2012. Perinatal undernutrition alters intestinal alkaline phosphatase and its main transcription factors KLF4 and Cdx1 in adult offspring fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 1490-1497.
- Lalles, J.P., 2014. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev* 72, 82-94.
- Mahagna, M., Nir, I., 1996. Comparative development of digestive organs, intestinal disaccharidases and some blood metabolites in broiler and layer-type chicks after hatching. *British Poultry Science* 37, 359-371.
- Malo, M.S., Moaven, O., Muhammad, N., Biswas, B., Alam, S.N., Economopoulos, K.P., Gul, S.S., Hamarneh, S.R., Malo, N.S., Teshager, A., et al., 2014. Intestinal alkaline

- phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306, G826-838.
- Palo, P.E., Sell, J.L., Piquer, F.J., Vilaseca, L., Soto-Salanova, M.F., 1995. Effects of nutrient restriction on broiler chickens. 2. Performance and digestive enzyme activities. *Poultry Science* 74, 1470-1483.
- Shifrin DA, Jr., McConnell RE, Nambiar R, Higginbotham JN, Coffey RJ, Tyska MJ. 2012. Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial-microbial interactions. *Curr Biol* 22:627-631.
- Traber PG, Gumucio DL, Wang W. 1991. Isolation of intestinal epithelial cells for the study of differential gene expression along the crypt-villus axis. *American Journal of Physiology* 260:G895-903.
- Vaishnava S, Hooper LV. 2007. Alkaline phosphatase: keeping the peace at the gut epithelial surface. *Cell Host Microbe* 2:365-367.
- Weiser MM. 1973. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 248:2536-2541.
- Walter, K., Schutt, C. 1974. Acid and alkaline phosphatase in serum (two-point method), in: Bermeyer, H.U. (Ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 856–860 (New York, Academic Press).
- 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 prélèvement et d'extraction des tissus intestinaux pour dosage enzymatique
Protocole de dosage des protéines dans les extraits de muqueuse digestive