



HAL
open science

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

Maryse Leconte, Serge Mallet, Irène Gabriel

► To cite this version:

Maryse Leconte, Serge Mallet, Irène Gabriel. Mode opératoire : Dosage de l'activité de la maltase dans la muqueuse intestinale d'oiseaux d'élevage. 2015. hal-03794890

HAL Id: hal-03794890

<https://hal.inrae.fr/hal-03794890>

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 maltase
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, Maltase, 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 l'activité de la maltase dans des extraits de muqueuse intestinale de poulet ou d'autres oiseaux d'élevage. Il s'agit d'une activité enzymatique de la muqueuse de l'intestin impliquée dans l'étape finale de la digestion des glucides, après action de l'amylase sur l'amidon, conduisant à la production de dextrine (oligosides de glucose), maltose et glucose, les dextrines continuant à être hydrolysées (Siddons, 1970, Hu et al, 1987).

2. Principe du dosage enzymatique

Il existe plusieurs méthodes de dosage de cette enzyme (EC 3.2.1.20) par des méthodes colorimétriques.

Une de ces méthodes, largement utilisée, consiste en un dosage en deux étapes, selon la méthode de Dahlqvist (1964). Elle a été utilisée dans le laboratoire (Gabriel et al, 2003), mais présente l'inconvénient d'être relativement longue et non transposable en plaque 96 puits.

Une autre méthode développée par Vanni et Hanozet (1980) et améliorée par Giorgi et al (1992) présente l'avantage de se dérouler en une seule étape de dosage. Développée initialement en tube à l'aide d'un spectrophotomètre, elle est transposable en plaque 96 puits (Williams et al, 2008). Elle peut, soit être réalisée avec une mesure en 2 temps comme dans sa description originale (Giorgi et al 1992), soit pour augmenter la précision, être effectuée par une mesure en cinétique (Williams et al, 2008).

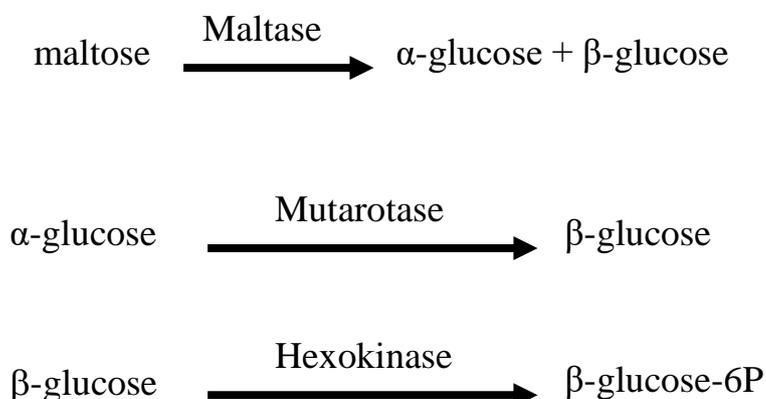
Bien que ce dosage soit réalisé en une seule étape, plusieurs étapes d'hydrolyse ont lieu au cours de la réaction. Le dosage consiste à mesurer le glucose libéré par la maltase à partir d'un substrat (le maltose) modifié ultérieurement en un produit détectable.

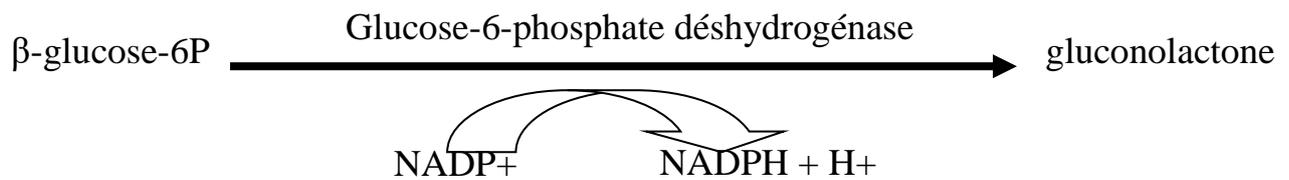
Dans une première étape, la maltase, qui est une disaccharidase, hydrolyse le maltose en α -glucose et β -glucose.

Dans un deuxième temps, la mutarotase présente dans le réactif convertit les molécules de α -glucose en β -glucose. Ainsi, il n'y a plus que des molécules de β -glucose dans la solution.

Dans une troisième étape, l'hexokinase catalyse la réaction de phosphorylation des hexoses sur leur carbone n° 6, convertissant le glucose en glucose-6-phosphate.

Dans une dernière étape, le β -glucose-6-phosphate est transformé en gluconolactone à l'aide de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, en présence de NADP⁺ qui devient alors NADPH + H⁺.





La densité en **gluconolactone** est alors lue à une longueur d'onde de 340 nanomètres.

La saccharase (EC 3.2.1.48) peut se doser selon un protocole similaire (Giorgi et al 1992).

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)
- Acide maléique (116.07 g/mol) (Sigma M 0375)
- MgCl₂, 6H₂O (203.3 g/mol) (Sigma M 0250)
- D-Maltose monohydrate (C₁₂H₂₂O₁₁ H₂O ; 360.31 g/mol) (Sigma M 5885)
- NaOH à 0,1 N (ou 1N)
- Adénosine-5'-triphosphate, ATP (ATP-Na₂H₂ x 3 H₂O: Mr = 605.2 g/ mol) (Roche, 10 519 979 001, 1 g)
Stockage à 4°C
- Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADP (NADP-Na₂: Mr = 787.4g /mol) (Roche, 10 128 031 001, 100 mg)
Stockage à 4°C
- D-(+)-Glucose (Dextrose) (C₆H₁₂O₆; 180.16 g/mol) (Sigma G8270)
- Glucose 6-phosphate d\`eshydrog\`enase (G6P-DH) (Roche, 10 127 671 001 ; 10 mg (2ml))
Stockage à 4°C
Activité différente selon le lot d'enzyme commerciale
Ex : En 2006, solution à ≈500 UI/ml
Ex : En 2015, solution à 1085 UI/ml à 30°C
- Hexokinase (Roche, 11 426 362 001 ; 1 500 U/ml, 1 ml)
Stockage à 4°C
- Mutarotase (Aldose 1-epimerase, extrait de rein de porc) (Bio Basic Inc. en passant par Clinic Science)

Stockage à 4°C

Activité différente selon le lot d'enzyme commerciale

Ex : En 2006, solution à $\approx 54\,000$ UI/ml

Ex : En 2015, solution à 0.159MU/5.8 ml, soit 27 414 U/ml

3.2. Petit matériel

- Pour chaque échantillon :

Tube(s) en polystyrène (PS) de 3 ml pour la(es) dilution(s)

- Pour la gamme

Tube en polystyrène (PS) de 3 ml pour la solution de départ, et 0.5 ou 1.5 ml pour les différents points de la gamme

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

* Dans portoir à cônes pour les pipettes multicanaux

- Combitips® pour la distribution du tampon pour les échantillons de la gamme

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

- Plaque de dilution 96 puits de 500 μ l / puit (besoin de 150 μ l / échantillon)

- Plaque 96 puits à fond plat (volume total de 350 μ l ; pour de 200 μ l de réactif)

- Glace pilée pour les dilutions

4. Appareillage

- Balance de précision à 0.1 mg

- pH mètre

- Lecteur de plaque 96 puits, thermostaté (37°C, voir 39°C) et mesure en cinétique pour une lecture de densité optique à 340 nm** (Tecan®, modèle Infinite M200)

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

** Si lecteur avec filtre, choisir le plus proche du maximum d'absorption (340 nm)

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

5. Mode opératoire

5.1. Préparation des tampons

- Tampon PBS KCl NaCl 10 mM

1 pastille / 200 ml d'eau déminéralisée

Conservation une semaine à 4°C

- Tampon maléate :

Objectif : tampon maléate 45 mM avec MgCl_2 8 mM dans le milieu final (200 μl avec un apport de 150 μl de solution de substrat)

Réactif	Pour 20 ml (1 plaque) (1)
Acide maléique (60 mM)	139.3 mg
$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ (10.7 mM)	44,37 mg
Ajouter de l'eau déminéralisée	18 ml
Ajuster le pH à 6,8	NaOH à 0,1 N
Compléter dans une fiole jaugée	20 ml

(1) Une plaque de 96 puits correspond à 6 points de la gamme en double et 28 échantillons en triple, soit 14.4 ml ; avec une marge de sécurité à cause du volume perdu avec la gouttière utilisée pour le pipetage avec la pipette multicanaux

Conservation plusieurs semaines (contrôler le pH régulièrement afin de s'assurer de sa bonne conservation)

5.2. Dilution de l'extrait de muqueuse

Les échantillons 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 1/5 pour des échantillons de duodénum, jéjunum et 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 1/30 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 (Voir protocole de la Phosphatase alcaline).

Réalisation des dilutions :

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 (Voir protocole de la Phosphatase alcaline).

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.

5.3. Préparation de la gamme étalon

Peser 30 mg de glucose dans un bécher et ajouter 9 ml de PBS, dissoudre à l'aide un barreau aimanté, et compléter à 10 ml avec du PBS dans une fiole.

-Dilution de la gamme :

No tube	Concentration finale		Dilution de la solution mère	Solution mère de glucose (μ l)	PBS (μ l)
	μ g/ml	mM			
1	0	0	-	-	5000
2	60	0.33	0.02	100	4900
3	120	0.66	0.04	200	4800
4	180	1.00	0.06	300	4700
5	240	1.33	0.08	400	4600
6	300 *	1.66	0.1	500	4500

* Au-delà de cette concentration, la gamme n'est plus linéaire (saturation) ; Conduit à une DO à 340 nm de 1.5

5.4. Préparation du substrat

Solution de substrat : Maltose / Enzymes (contient les enzymes des phases post-maltase)
Ce réactif doit être préparé **extemporanément** (pour chaque demi-journée de dosage)

Réactifs	Quantité pour 20 ml, 1 plaque (1)
Maltose 14.7 mM dans la solution de substrat (11 mM dans le milieu final*)	105.7 mg
ATP (Adénosine-5'-Tri-Phosphate) 1.73 mM dans la solution de substrat (1.3 mM dans le milieu final*)	21 mg
NADP (Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-Phosphate) 1.33 mM dans la solution de substrat (1 mM dans le milieu final*)	21 mg
Dissoudre dans du Tp maléate	18 ml
G6P-DH (Glucose 6-phosphate dehydrogenase) 1.2 UI/ml dans la solution de substrat (0.9 UI/ml dans le milieu final*) Activité différente selon le lot d'enzyme commerciale Ex : En 2006, solution à \approx 500 UI/ml (Dilution 1/416) Ex : En 2015, solution à 1085 UI/ml à 30°C (Dilution 1/904)	Selon le lot d'enzyme 48 μ l (lot 2006) 22 μ l (lot 2015)
Hexokinase (HK) 4.93 UI/ml dans la solution de substrat (3.7 UI/ml dans le milieu final*) Solution commerciale à 1 500 UI/ml (Dilution 1/304)	65.7 μ l
Mutarotase (MR) 333.3 UI/ml dans la solution de substrat (250 UI/ ml dans le milieu final (2)) Activité différente selon le lot d'enzyme commerciale Ex : En 2006, solution à \approx 54 000 UI/ml (Dilution 1/162) Ex : En 2015, solution à 27 414 U/ml (Dilution 1/82)	Selon le lot d'enzyme 123.5 μ l (lot 2006) 243 μ l (lot 2015)
Compléter avec du tampon maléate	à 20 ml

UI : unité internationale

(1) Une plaque de 96 puits correspond à 6 points de la gamme en double et 28 échantillons en triple, soit 14.4 ml ; avec une marge de sécurité à cause du volume perdu avec la gouttière utilisée pour le pipetage avec la pipette multicanaux. Compte tenu du coût des réactifs, ne préparer que le volume nécessaire.

(2) D'après Giorgi et al (1992)

Avant le dosage mettre le substrat à la température du dosage dans une étuve à 37°C (maximum 15 mn)

5.5. Réaction colorimétrique

Plan de plaque (96 puits)

Cf Protocole de la Phosphatase alcaline à l'exception du Témoin 'substrat' qui est le 1^{er} point de la gamme de glucose. On peut donc déposer 28 échantillons en triple.

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 **50 µl** de chaque dilution de la gamme
- Ajouter **150 µl** de la solution de substrat (Maltose / Enzymes)

- **Pour les échantillons** : dépôt des échantillons en triple
- Mettre **50 µl** d'extrait de muqueuse (ou de dilution)* avec une pipette multicanal sur la plaque 96 puits à température ambiante**
- * A partir de la plaque de dilution 96 puits
- ** Suffisamment rapide pour qu'il n'y ait pas de dégradation notable des enzymes

Remplissage en 1 à 2 min / plaque

- Ajouter **150 µl** la solution de substrat (Maltose / Enzymes) 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 340 nm T_0 min *
- Mise à l'étuve à **39°C** pendant **20 min**
- Deuxième lecture à 340 nm T_{20} min**
- * Doit commencer après la phase de démarrage de la réaction (cinétique + lente que la zone linéaire) (au bout de 20 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 80 min* à **39°C** toutes les 45 sec à 340 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 50 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 $T_{20 \text{ min}}$

Var DO = DO $T_{20 \text{ min}}$ – DO $T_{0 \text{ min}}$

Rapportée au 20 min de réaction, soit Var DO / 20 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 mesurable dans le cas de ce dosage (DO > 1.5 ; phénomène de saturation) 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 : 0 à 80 min, pour une cinétique de 80 min)

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

Pour chaque échantillon, noter le temps maximum pour lequel la DO est inférieure à 1.5 (mesure non exploitable au-delà du fait de la saturation)

Dans la zone sélectionnée précédemment (0 à 80 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 (0-10 min, 10-20 min, 20-30 min , ... 60-80 min)

* Des mesures sur des gammes de temps plus courtes conduisent à trop de fluctuations aléatoires, mais peuvent dans le cas de la maltase, permettre de confirmer ou non la localisation de la pente maximum lorsque la lecture est en limite par rapport à la DO de 1.5 (saturation)

5.6.2. Calcul

1. Réponse du substrat (Témoin « substrat »)*

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

En pratique, pour la maltase, cette valeur du témoin 'substrat' est négligeable, donc il est inutile d'en tenir compte

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 (Pour éviter les variations observées sur une gamme de temps de 5 min)

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

Dans le cas de la maltase, contrôler que cette vitesse maximale se trouve dans la zone de $DO < 1.5$.

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):

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

Rq : La gamme de glucose (DO à 340 nm due à la gluconolactone) évolue légèrement au cours du temps (Augmentation de $T=0$ à 15-25 min, puis baisse ; Ex pour le point 6 à $300\mu\text{g}/\text{ml}$: $DO_{0\text{min}} = 1.40$, $DO_{15-25\text{min}} = 1.51$, $DO_{55\text{min}} = 1.45$). Ceci entraîne une légère variation du coefficient 'a' en fonction du temps de 4 à 5%. Pour les échantillons, la quantité de glucose produit (et donc de gluconolactone) évoluant avec le temps, prendre une valeur moyenne pour le coefficient « a » sur la gamme de temps de mesure des vitesse maximales des échantillons (entre 10 et 60 min).

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 : 30 pour la maltase)

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

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

Or 1 U = 1 μmol de maltose hydrolysé / min (définition internationale)

En tenant compte du fait qu'une mole de maltose conduit à 2 moles de b-glucose, et donc 2 moles de gluconolactone

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 = $(V(\mu\text{M}/\text{min}) \times \text{Dilution}) \times [\text{Vol (ml)} / 1000]$

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

En tenant compte du fait qu'une mole de maltose conduit à 2 moles de b-glucose, et donc 2 moles de gluconolactone

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

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

Le résultat s'exprime en U / g de tissus

En tenant compte du fait qu'une mole de maltose conduit à 2 moles de b-glucose, et donc 2 moles de gluconolactone

8. Expression par rapport à la quantité 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.)

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

* Dilution

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

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

En tenant compte du fait qu'une mole de maltose conduit à 2 moles de b-glucose, et donc 2 moles de gluconolactone

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.

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

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

En tenant compte du fait qu'une mole de maltose conduit à 2 moles de b-glucose, et donc 2 moles de gluconolactone

6 Hygiène et sécurité

6.1. Utilisation des réactifs

Tous les travaux doivent être effectués avec une blouse et des gants.
Voir les « phrases de risques » pour chaque réactif

6.2. Elimination des produits

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

8. Références bibliographiques

- Dalvquist, A., 1964. Method for assay of disaccharidases. *Analytical Biochemistry*, 7, 18-25.
- 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.
- Giorgi, M., Vanni, P., Pinzauti, G. (1992). A new continuous optical assay for maltase and sucrase. *Enzyme*; 46: 299-303.
- Hu CB, Spiess M, Semenza G. 1987. The mode of anchoring and precursor forms of sucrase-isomaltase and maltase-glucoamylase in chicken intestinal brush-border membrane. Phylogenic implications. *Biochim Biophys Acta* 896:275-286.
- 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.
- 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.
- 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.
- Siddons RC. 1970. Heat inactivation and sephadex chromatography of the small-intestine disaccharidases of the chick. *Biochemical Journal* 116:71-78.
- Vanni, P., Hanozet, G. M. (1980). Continuous optical assay of sucrase and other glucosidases. *Experimantia*; 9: 1035-1037.
- 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.

9. Annexe

Protocole de prélèvement et d'extraction des tissus intestinaux pour dosage enzymatique

Protocole de dosage des protéines dans les extraits de muqueuses

Protocole de dosage de la Phosphatase alcaline