

L'ISTHME GASTRIQUE DE 2 LIGNEES DE POULETS SELECTIONNEES SUR LEURS CAPACITES DIGESTIVES PRESENTE DES DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES

**Rideau Nicole, Godet Estelle, Combémoré Camille, Chaudeau Mylène, Carré Bernard,
Mignon-Grasteau Sandrine**

INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 NOUZILLY, FRANCE

Nicole.Rideau@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Les lignées de poulets (D+/D-) sélectionnées sur leur capacité de digestion se caractérisent par des différences anatomiques et physiologiques dans lesquelles l'estomac joue un rôle prépondérant. Dans le but de préciser les mécanismes impliqués, nous avons caractérisé une structure essentielle régulant l'activité motrice de l'estomac des oiseaux, l'isthme situé entre le proventricule et le gésier. Nous présentons ici une étude histologique de l'isthme des poulets D+ et D-. Des coupes transversales d'isthme (9 µm, n=10/lignée) ont été réalisées à l'aide d'un cryo-microtome puis colorées à l'hématoxyline-éosine. La surface et la forme des différents tissus ont été quantifiées sur une coupe représentative par lame à l'aide du logiciel d'analyse d'images « Image J ». La lumière occupe 11 % de la surface totale de la coupe chez les D- contre 24 % chez les D+ (p= 0,002). La proportion relative de muqueuse est plus élevée chez les D- que chez les D+ [47 % (D-) et 39% (D+) de la surface totale de la coupe, p=0,01]. Du côté de la lumière, la muqueuse des poulets D- est significativement plus ovale et plus sinueuse que celle des poulets D+ ; la partie musculaire de la muqueuse (*muscularis mucosae*) est relativement plus développée chez les D- que chez les D+ : 16 % contre 11 % de la surface totale de la coupe, respectivement (p=0,003). Ces observations sont à mettre en relation avec les modifications de la motricité gastrique plus importante chez les D- comparés aux D+.

ABSTRACT

The gastric isthmus from two chicken lines selected on their digestive capacity presents histological and morphological differences

Two chicken lines (D+/D-) selected on their digestive capacity are characterized by anatomical and physiological differences in which the stomach plays a paramount role. In order to further understand implied mechanisms, we characterized a structure mainly involved in stomach motility regulation in birds, the isthmus located between the proventriculus and the gizzard. We present here histological study of the isthmus from D+ and D- lines. Nine µm-thick cross sections (n=10/line) were cut using a cryostat and stained with a routine procedure using Meyer Hemalun and eosin. Surface and shape of the tissues were quantified using the image analysis software "Image J". The lumen occupies 11% of the entire D- isthmus surface against 24% for D+ (p=0.002). The mucosa relative surface is higher in D- than in D+ [47% (D-) versus 39% (D+), p=0.01]. It is significantly more oval and more sinuous on the lumen side in D- than in D+ chickens; the muscular layer (*muscularis mucosae*) of the mucosa is relatively more developed in D- than in D+ (16% and 11% of the section (p=0.003), respectively. These observations are to be related with increased gastric motility in D- as compared to D+.

INTRODUCTION

Deux lignées de poulets D+/D- ont été sélectionnées sur leur capacité digestive estimée à partir de l'énergie métabolisable apparente corrigée pour un bilan azoté nul (EMan) mesurée à l'âge de 3 semaines (Mignon-Grasteau et al., 2004). Elles se caractérisent par une différence de digestibilité (35%, -8 %, et -17% d'écart moyen entre D+ et D- pour les lipides, les hydrates de carbone et les protéines, respectivement- Carré et al., 2008), des différences morphologiques de la taille du gésier et de l'intestin grêle (Péron et al., 2006; Garcia et al., 2007; Rougière et al., 2009a) et des modifications de la structure histologique de l'intestin grêle (de Verdal et al., 2010). Le temps de rétention moyen dans le proventricule et le gésier est 2 fois plus élevé dans la lignée D+ que dans la lignée D- (Rougière et Carré, 2010) lié à une modification de la motricité gastrique (Rougière et al., 2012) tandis que le transit digestif est accéléré chez les D- comparés aux D+ (Rougière et Carré, 2010). L'ensemble des résultats suggère que le proventricule et le gésier jouent un rôle central dans la différence de digestibilité entre lignées (de Verdal et al., 2011).

L'estomac des oiseaux est constitué de 2 compartiments distincts : le proventricule (PV) et le gésier qui possèdent respectivement une fonction sécrétrice (HCl et pepsine) et une fonction motrice (broyage des aliments et transit). L'isthme situé entre le PV et le gésier (isthme PV-gésier) et la jonction gastroduodénale (ou antre pylorique) sont 2 zones particulières : une activité de type « pace maker » a été mise en évidence par technique électro-physiologique pour la première région (Chaplin et Duke, 1990 ; Reynhout et Duke, 1999) et un rôle secondaire dans régulation motrice pour la seconde région (Chaplin et Duke, 1990). L'antre pylorique est par ailleurs très riche en cellules endocrines intervenant dans la régulation des sécrétions et de la trophicité de la muqueuse proventriculaire (Rawdon et Andrew, 1999). Il apparaît donc intéressant de caractériser ces 2 zones essentielles impliquées dans la régulation motrice et sécrétrice de l'estomac du poulet puis de rechercher s'il existe des différences (qualitatives et/ou quantitatives) entre les lignées D+ et D-. Nous présentons ici l'étude histologique de la région isthmale et nous montrons des différences morphologiques significatives entre lignées D+ et D-.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Les poulets (n=60) sont issus des parents de la génération 10. Ils ont été bagués, pesés et sexés à l'éclosion, élevés au sol de 0 à 11 jours, placés en cages individuelles et soumis aux conditions d'élevage (programme lumineux et température) similaires à celles pratiquées pendant la phase de sélection. Les poulets ont reçu de J0 à J23 un aliment démarrage à 3000 kcal/kg MS et 21% de protéines comportant 52,5% de blé Rialto donné *ad libitum* sous forme de granulés. Les animaux ont été pesés lors de la mise en place dans les cages (12 j) et la veille des prélèvements (à 22 j, correspondant à l'âge de la sélection). La consommation individuelle a été contrôlée entre le début de la mise en cage et le jour des prélèvements.

1.2. Prélèvements

Le proventricule et le gésier ont été prélevés immédiatement après abattage. L'isthme PV-gésier, et la jonction gastro-duodénale ont été rapidement disséqués, lavés avec une solution physiologique (PBS), pesés et congelés dans de l'isopentane puis stockées à -80°C. Le proventricule et le gésier ont été vidés, lavés et conservés à 4°C pendant 4 h pour être dégraissés et pesés.

1.3. Etude histologique

L'étude histologique de la région isthmale (située entre le PV et le gésier) a été réalisée sur 10 échantillons (1 échantillon /animal) de chaque lignée choisis de façon aléatoire. Des coupes transversales de l'isthme (9µm) ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM 3050S), colorées à l'hématoxyline-éosine de Meyer et analysées sous loupe binoculaire (Nikon, SMZU). Une coupe représentative correspondant à la région isthmale la plus étroite, composée de muscles lisses et dépourvue de glande proventriculaire a été photographiée en vue de quantifier à l'aide du logiciel d'analyse d'images « Image J » les différentes structures tissulaires composant l'isthme. Le logiciel calcule la surface des structures délimitées manuellement. La surface réelle de chaque couche tissulaire est obtenue par soustraction. La forme des contours et l'aspect plus ou moins lisse des tracés ont été analysés à l'aide des indices « circularité » et « solidité ». L'indice « circularité » égale 1 lorsque le contour est circulaire et tend vers 0,1 au fur et à mesure que le cercle s'aplatit. L'indice « solidité » égale 1 lorsque le contour est régulier (ou lisse) et ne présente pas de déformation ou de sinuosités, il tend vers 0,1 lorsqu'il est très contourné.

1.4. Analyse statistique

La comparaison des moyennes est effectuée par ANOVA à un facteur (Statviews, Abacus concepts 1996. Inc, Berkeley, CA).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les caractéristiques des poulets dont les échantillons ont été utilisés pour cette étude sont présentées sur le tableau 1. Ils sont conformes aux données de la Lignée D+/D- (Mignon-Grasteau et al., 2004). La figure 1 montre les coupes d'isthme transversal des poulets D+ et D- après coloration HE. A l'œil nu, on voit que la lumière de l'isthme est plus importante chez les D+ que chez les D-. Le contour de la lumière limité par l'épithélium est en outre lisse chez les D+ comparés aux D- qui présentent de nombreux replis au niveau de l'épithélium.

La structure histologique du tractus digestif des oiseaux ressemble à celle des mammifères. Nous n'avons pas trouvé d'information dans la littérature concernant la région de l'isthme PV-gésier en particulier. En section transversale, on distingue successivement la lumière, la muqueuse constituée de l'épithélium (qui secrète un mucus, avec une partie desquamée et une partie non desquamée) et de la *muscularis mucosae* (MM), la sous-muqueuse constituée de tissus conjonctif, la musculature constituée des fibres lisses circulaires. On note l'absence de fibres lisses longitudinales, en accord avec Bennett et Cobb (1969) montrant qu'il n'y a pas de muscle longitudinal au niveau du gésier.

Analyse des surfaces (tableau 2). La surface totale de la section transversale de l'isthme gastrique (section incluant la lumière) est significativement plus faible chez les D- que chez les D+. La surface de la lumière est 4 fois plus faible chez les D- que chez les D+, la surface de tissus des D- représente 72 % de celle des D+. La surface absolue de l'épithélium non desquamé et des fibres lisses circulaires est également significativement plus faible chez les D- que chez les D+. A l'inverse, la surface absolue de la couche « mucus + épithélium desquamé » et celle de la *muscularis mucosae* ne diffère pas significativement entre lignées ($p>0,05$). La surface absolue de la muqueuse totale (épithélium total + *muscularis mucosae*) est significativement plus faible chez les D- que chez les D+ ($p=0,02$, rapport D-/D+=0,74, non montré). Les surfaces rapportées à la surface totale de la coupe sont présentées tableau 2 et figure 1. La lumière occupe 11 % de la surface totale de la coupe chez les D- contre 24 % chez les D+ ($p=0,002$). La proportion relative de muqueuse est plus élevée chez les D- que chez les D+ : 47 % (D-) et 39% (D+) de la surface totale de la coupe, ($p=0,01$). La *muscularis mucosae* est relativement plus développée chez les D- que chez les D+ occupant respectivement 16 % et 11 % de la surface totale de la coupe ($p=0,003$). Les surfaces relatives d'épithélium total et de fibres lisses circulaires ne présentent pas de différence entre lignées. Les fibres lisses circulaires occupent une surface

relative similaire chez les D- et les D+, en moyenne 39% de la surface totale de la coupe (42 % (D-) et 37 % (D+), $p=0,10$).

Analyse morphologique (tableau 3). L'indice « circularité » indiquant si la structure délimitée est plus ou moins proche d'un cercle, évolue de 0,41 (contour de la lumière) à 0,89 (contour des FL) pour les D- versus 0,67 (contour de la lumière) à 0,92 (contour des FL) pour les D+ (tableau 3). La limite externe des coupes tend vers un cercle (délimitation des fibres lisses circulaires) chez les D- comme chez les D+ ($p>0,05$). Le rapport d'indice de circularité D-/D+ est de 0,56, 0,89 et 0,96 respectivement au niveau des limites de l'épithélium desquamé, de la MM et des FL. L'indice « solidité » qui rend compte de l'aspect plus ou moins lisse du contour évolue de 0,65 (contour de la lumière) à 0,98 (contour des FL) pour les D- versus 0,90 à 0,99 pour les D+ (tableau 3). Le rapport d'indice « sinuosité » D-/D+ est de 0,76, 0,96 et 1 respectivement au niveau des limites de l'épithélium desquamé, de la MM et des FL.

Dans une étude histologique récente de l'intestin grêle, de Verdal et al (2011) ont montré que les poulets de la lignée D- ont développé des processus adaptatifs induits par des changements morphologiques et histologiques permettant d'augmenter la capacité d'absorption de l'intestin grêle. Ainsi la couche musculaire (*tunica muscularis*) est significativement plus épaisse : +17 à +24% au niveau de tous les segments (duodénum, jéjunum et iléon) chez les D- comparés aux D+ ; le nombre relatif de cellules en gobelet (par villosité) est en outre significativement plus élevé (+27 à +34%) dans le jéjunum et l'iléon des D- par rapport aux D+. Les modifications de la muqueuse de l'isthme PV-gésier mises en évidence dans la présente étude vont dans le même sens. Le développement de la *muscularis mucosae* peut être mis en relation avec l'augmentation de l'activité motrice du gésier, plus élevée chez les D- que chez les D+ (Rougière et al., 2012). Le plissement plus important de la muqueuse de l'isthme chez les D- vs les D+ est en accord avec une activité contractile accrue.

CONCLUSION

L'isthme PV-gésier des poulets D+/D- présente des différences morphologiques observables à l'œil nu. Ces différences sont quantifiables et vérifiées au niveau statistique ($n=10$ /lignée). La surface totale des coupes transversales d'isthmes est significativement plus faible chez les D- que chez les D+. La différence se situe principalement au niveau de la lumière dont la surface est 4 fois plus faible chez les D-. La muqueuse de l'isthme des poulets D- est du côté de la lumière, significativement plus ovale et plus sinueuse que celle des poulets D+; sa partie musculaire

(*muscularis mucosae*) est significativement plus développée (surface en valeur absolue et relative) et sa limite avec l'épithélium plus contournée chez les poulets D- que chez les poulets D+. On peut émettre l'hypothèse qu'il existe une relation entre d'une part l'activité motrice du gésier plus importante des D- comparés aux D+ (Rougière et al., 2012), et d'autre part l'augmentation de la

couche musculaire de la muqueuse et l'aspect contourné de la lumière. Une étude comparative de l'innervation de l'isthme et de sa régulation est clairement attendue pour les lignées D+/D-.

REMERCIEMENTS. Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'Agence Nationale de la Recherche, ANR PCS-09-GENM-004 «CHIEF».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bennett T., Cobb J.L. S. 1969. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 99:109-120
 Carré B., Mignon-Grasteau S., Besnard, J., Rougière, N., Jun, H. 2008. 12th World Poultry Congress, Brisbane.
 Chaplin, S. B., Duke, G. E., 1990. Am.J. Physiol. 259: 481-489
 de Verdal, H., Mignon-Grasteau, S., Jeulin, C., Le Bihan-Duval, E., Leconte, M., Malle, S., Martin, C., Narcy, A. 2010. Poult Sci. 89 (9):1955-61.
 de Verdal, H., Narcy, A., Bastianelli, D., Chapuis, H., Mème, N., Urvoix, S., Le Bihan-Duval. E., Mignon-Grasteau, S. 2011. BMC Genet. 12:59
 Garcia, V., Gomez, J., Mignon-Grasteau, S., Sellier, N., Carré, B. 2007. Animal 1:1435-1442.
 Mignon-Grasteau, S., Muley, N., Bastianelli, D., Gomez, J., Péron, A., Sellier, N., Millet, N., Besnard, J., Hallouis, J. M., Carré, B. 2004. Poult. Sci. 83:860-867.
 Péron, A., Gomez, J., Mignon-Grasteau, S., Sellier, N., Besnard, J., Derouet, M., Juin, H., Carré, B. 2006. Poult. Sci. 85:462-469.
 Rawdon, B.B., Andrew, A. 1999. Prog Histochem Cytochem. 34(1):3-82.
 Reynhout J.K., Duke, G.E., 1999. J Exp Zool.; 283(4-5):426-40.
 Rougière, N., Gomez, J., Mignon-Grasteau, S., Carré B. 2009. Poult. Sci. 88:1206-1215.
 Rougière, N., Carré, B. 2010. Animal 4:1861-1872.
 Rougière, N., Malbert C.-H., Rideau N., Cognié J., Carré, B. 2012. Poultry Science 91 :460-467.

Tableau 1. Caractéristiques des poulets D+/D- utilisés pour l'étude histologique (n=10/ lignée)

	D+	D-	p
Poids corporel (0 j)	35.7 ± 0.9	36.4 ± 0.8	NS
Poids corporel (22 j)	476 ± 7	405 ± 12	***
IC (12 -22j)	1.6 ± 0.1	2.3 ± 0.2	***
Pds PV total (g)	5.2 ± 0.5	3.8 ± 0.1	***
Pds Gésier total (g)	14.9 ± 0.6	9.7 ± 0.2	***

n= 10 moy ± SEM, ***p≤0.001

Tableau 2. Surfaces des tissus constituant l'isthme PV-Gésier des poulets D+/D-

Surfaces	Surfaces absolues (cm2)			Surfaces relatives (/ surface de la coupe)		
	D+	D-	p	D+	D-	p
Surface de la coupe	0.93 ± 0.08	0.56 ± 0.06	***			
Lumière	0.24 ± 0.05	0.06 ± 0.01	***	0.24 ± 0.03	0.11 ± 0.02	***
Mucus, desquamations	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	NS	0.87 ± 0.01	0.93 ± 0.02	NS
Epithélium non desquamé	0.18 ± 0.01	0.12 ± 0.01	**	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01	NS
Epithélium total	0.26 ± 0.02	0.18 ± 0.02	**	0.28 ± 0.01	0.31 ± 0.02	NS
Muscularis mucosae	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	NS	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.01	**
Fibres lisses circulaires	0.33 ± 0.02	0.24 ± 0.03	**	0.37 ± 0.02	0.42 ± 0.02	NS

Quantification à l'aide du logiciel « Image J » ; n=10, moy ± SEM, * P≤0.05 ; ** P ≤0.01 ; ***P≤0.001

Dixièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, La Rochelle, du 26 au 28 mars 2013

Tableau 3. Morphologie des tissus constituant l'isthme PV-Gésier des poulets des lignées D+/D-
Circularité Solidité

	D+	D-	p	D+	D-	p
Lumière	0.67 ± 0.04	0.41 ± 0.08	*	0.90 ± 0.01	0.65 ± 0.08	*
Mucus +desquamations	0.73 ± 0.04	0.40 ± 0.05	***	0.92 ± 0.02	0.70 ± 0.05	***
Epithélium non desquamé	0.84 ± 0.03	0.60 ± 0.04	***	0.97 ± 0.01	0.87 ± 0.02	***
Muscularis mucosae	0.90 ± 0.02	0.81 ± 0.04	*	0.99 ± 0.00	0.95 ± 0.01	*
Fibres lisses circulaires	0.92 ± 0.01	0.89 ± 0.03	NS	0.99 ± 0.00	0.98 ± 0.01	NS

Quantification à l'aide du logiciel « Image J » ; n= 10 moy ± SEM, * p≤0.05 ; ** p ≤0.01 ; ***p≤0.001

Figure 1. Aspect macroscopique des coupes transversales d'isthme PV-gésier des poulets des lignées D+/D-
(Hématoxyline- éosine, x15)

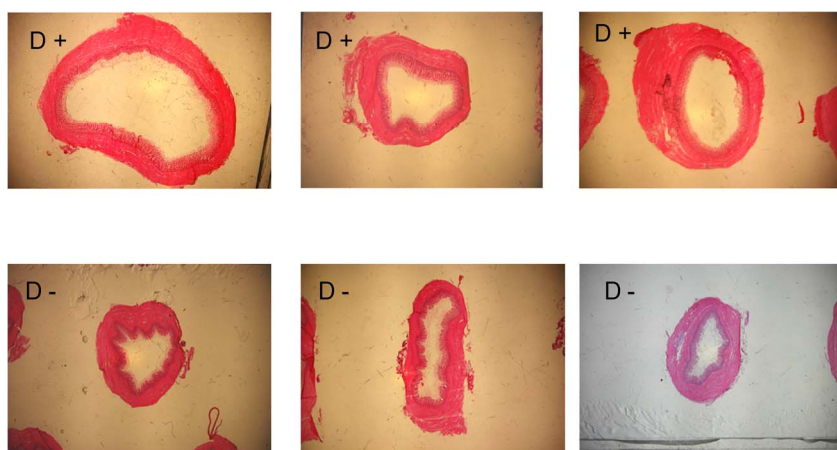


Figure 2. Surface relative (par rapport à la surface de la coupe, valeurs du tableau 2) des tissus composant l'isthme PV-gésier des poulets des lignées D+/D- (n=10)

