

Université de Montréal

**Quantification des lymphocytes, éosinophiles et mucines
dans des biopsies duodénales de chevaux exposés à
différentes diètes**

par
Marine Rullier

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Juillet 2019

© Marine Rullier, 2019

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

Quantification des lymphocytes, éosinophiles et mucines dans des biopsies duodénales de
chevaux exposés à différentes diètes

Présenté par :

Marine Rullier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mathilde Leclère, présidente-rapporteuse

Daniel Jean, directeur de recherche

Pierre Hélie, codirecteur

Jean-Pierre Lavoie, codirecteur

Neda Barjesteh, membre du jury

Résumé

L'alimentation peut jouer un rôle sur le nombre et le type de leucocytes présents dans la muqueuse de l'intestin grêle. Les objectifs de cette étude sont de 1) quantifier et caractériser les lymphocytes et les éosinophiles de la lamina propria ainsi que 2) d'évaluer le type de mucine sur des biopsies duodénales de chevaux soumis à différentes diètes. Une variabilité des cellules et des mucines devrait être observée en fonction de l'alimentation. Sept juments ($n = 7$) ont d'abord reçu une alimentation riche en fibres pendant six semaines et ensuite, une alimentation riche en protéines pendant six autres semaines. Une biopsie endoscopique duodénale a été effectuée à la fin de chaque période de diète. Une coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, une immunohistochimie pour quantifier les lymphocytes T (CD3) et B (CD20) ainsi qu'une coloration AB PAS pour étudier les mucines ont été effectuées. Un compte des lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, au CD3 et au CD20 ainsi que des éosinophiles identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran a été fait. Les mucines ont été évaluées qualitativement. Pour 11 des 13 biopsies, le compte de lymphocytes totaux était plus élevé lorsqu'ils étaient identifiés avec l'immunohistochimie que lorsqu'ils étaient identifiés avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran ($p = 0,057$). Les juments, lorsqu'elles sont nourries avec une diète riche en protéines, présentent un ratio lymphocytes T/lymphocytes B qui augmente significativement ($p = 0,026$). Les éosinophiles et les mucines ne sont pas modifiés par ces deux diètes. Pour conclure, l'immunohistochimie est nécessaire pour démontrer l'impact de l'alimentation sur le ratio lymphocytes T/lymphocytes B de la lamina propria des biopsies duodénales de juments saines. De futures études pourront se servir de ces notions pour évaluer les facteurs de variation des leucocytes duodénaux dans le but d'établir des valeurs de références de ces cellules pour la muqueuse intestinale normale.

Mots-clés : Alimentation, biopsies endoscopiques duodénales, cheval, immunohistochimie, lymphocytes, quantification.

Abstract

Diet may play a role on the number and type of small intestinal mucosal leucocytes. The objectives of this study are 1) to quantify lymphocytes and eosinophils of the lamina propria and, 2) to evaluate the type of mucins present in duodenal biopsies from horses fed different diets. A variability in leukocytes and mucins should be observed with the diet change. Seven mares (n = 7) were fed for six weeks a diet rich in fibers followed by another six weeks of a diet rich in proteins. One endoscopic duodenal biopsy per horse was taken at the end of each period of diet. An hematoxylin-eosin-phloxin-saffron stain, an immunochemistry to evaluate T lymphocytes (CD3) and B lymphocytes (CD20) and an AB PAS stain to evaluate mucins were performed. A quantification of lymphocytes identified by hematoxylin-eosin-phloxin-saffron, CD3 and CD20 and of eosinophils by hematoxylin-eosin-phloxin-saffron was performed. Mucins were qualitatively evaluated. For 11/13 biopsies the lymphocyte count was higher when identified with immunochemistry than identified by hematoxylin-eosin-phloxin-saffron stain. Mares, when fed a protein rich diet, have a significantly higher ratio of lymphocytes T/lymphocytes B ($p = 0,026$). No differences were found for eosinophils and mucins with the diet change. These results indicate that immunochemistry is necessary to identify the impact of the diet on the lymphocytes T/lymphocytes B ratio of the lamina propria in duodenal biopsies from healthy mares. The results from this study can be used to evaluate factors contributing to duodenal leukocytes variation to establish reference values for the range of the number of leukocytes found in the normal equine intestinal mucosa.

Keywords : Diet, duodenal endoscopic biopsies, equine, immunochemistry, lymphocytes, quantification.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des sigles.....	10
Liste des abréviations.....	11
Remerciements.....	13
Introduction.....	15
Revue de littérature.....	17
1 Anatomie et histologie du tractus gastro-intestinal.....	17
1.1 Histologie de l'intestin grêle.....	19
1.1.1 Effet de l'âge sur l'histologie de la muqueuse intestinale.....	21
1.1.2 Effet des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur l'histologie de la muqueuse intestinale.....	21
1.1.3 Effet de l'alimentation sur l'histologie de la muqueuse intestinale.....	22
1.1.4 Effet de l'alimentation sur l'histologie de la muqueuse intestinale équine.....	23
2 Alimentation des chevaux : généralités.....	24
2.1 Foin.....	24
2.1.1 Fibres alimentaires.....	25
2.2 Pellets de luzerne.....	26
2.3 Moulée sucrée.....	28
3 Contexte clinique de l'utilisation des biopsies intestinales.....	28
3.1 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin chez le cheval.....	28
3.2 Biopsies intestinales de l'intestin grêle.....	30
3.2.1. Biopsies duodénales par endoscopie.....	33
3.2.2. Biopsies duodénales par chirurgie.....	33
3.3. Évaluation de l'inflammation leucocytaire.....	34
3.3.1. Immunohistochimie.....	34

3.3.1.1. Perte d'antigénicité	36
3.3.2. Méthodes de quantification des leucocytes identifiés à l'IHC.....	36
4 Immunité intestinale.....	37
4.1 Généralités	37
4.2 Les cellules caliciformes.....	39
4.3 Lymphocytes.....	40
4.3.1. Lymphocyte T.....	40
4.3.1.1 Molécules de surface.....	41
4.3.2. Lymphocyte B.....	43
4.3.2.1. Molécules de surface.....	44
4.4. Éosinophiles.....	44
4.5 Microbiote, immunité et alimentation.....	46
Résumé.....	49
Hypothèses et objectifs	51
Matériel et méthodes.....	52
1. Schéma expérimental de l'alimentation des juments	52
2. Biopsies duodénales endoscopiques	53
3. Immunohistochimie	55
4. Colorations histologiques.....	57
4.1. Hématoxyline-éosine-phloxine-safran.....	57
4.2. Alcian Bleu <i>Periodic Acid Schiff</i>	58
5. Technique de dénombrement cellulaire	59
5.1. Calcul de l'aire.....	59
5.2. Comptage des cellules.....	59
6. Classement des mucines	59
7. Qualité des biopsies endoscopiques duodénales.....	60
8. Statistiques	61
Résultats.....	63
1. Tests cliniques.....	63
2. Qualité des biopsies endoscopiques duodénales.....	63

3. Lymphocytes identifiés par immunohistochimie vs par hématoxyline-éosine-phloxine-safran.....	67
4. Le nombre de lymphocytes identifiés à l'immunohistochimie selon les diètes	69
4.1. Lymphocytes totaux (lymphocytes T + B)	69
4.2. Lymphocytes T	70
4.3 Lymphocytes B	72
4.4 Ratio de lymphocytes.....	74
5. Les éosinophiles selon les diètes.....	75
6. La composition des mucines selon les diètes.....	77
Discussion	79
1. Rappel des résultats.....	79
2. Hématoxyline-éosine-phloxine-safran vs immunohistochimie	79
3. Lymphocytes.....	82
3.1. Effets de l'alimentation.....	82
3.2. Comparaison des évaluations quantitatives	83
4. Éosinophiles.....	84
4.1. Effets de l'alimentation.....	84
4.2. Comparaison des évaluations quantitatives	85
5. Mucines.....	86
5.1. Effets de l'alimentation.....	86
6. Limites du protocole de l'alimentation.....	87
Conclusion et perspectives.....	89
Bibliographie.....	91
Annexe I : Protocole immunohistochimique pour CD3 et CD20	100
Annexe II : Protocole Hématoxyline-éosine-phloxine-safran	104
Annexe III : Protocole de coloration AB PAS.....	106
Annexe IV : Score de qualité des biopsies endoscopiques	108
Annexe V : Comptes exacts des lymphocytes T, B et éosinophiles.	109

Liste des tableaux

Tableau I. Analyse des constituants des deux diètes présentées aux juments de l'étude.	53
Tableau II. Nombre de biopsies pour chaque catégorie de qualité selon les colorations et les deux diètes.	64
Tableau III. Résultats de l'analyse statistique de l'impact de la qualité de la biopsie sur les comptes de cellules.	66
Tableau VI. Résultats de l'évaluation qualitative des mucines	77
Tableau V. Score de qualité donnée à chaque biopsie endoscopique	108
Tableau VI. Évaluations quantitatives des lymphocytes T de la lamina propria de biopsie endoscopique duodénale de chevaux sains pour les deux diètes.	109
Tableau VII. Évaluations quantitatives des lymphocytes B de la lamina propria de biopsie endoscopique duodénale de chevaux sains pour les deux diètes.	110
Tableau VIII. Évaluations quantitatives des éosinophiles de la lamina propria de biopsie endoscopique duodénale de chevaux sains pour les deux diètes.	111

Liste des figures

Figure 1. Anatomie du système gastro-intestinal du cheval de la portion caudale de l'œsophage jusqu'au rectum.....	17
Figure 2. Histologie de base.....	19
Figure 3. Anatomie et histologie de l'intestin grêle.....	20
Figure 4. Biopsies duodénales équines.	31
Figure 5. Biopsie duodénale équine prise par endoscopie de qualité adéquate.....	32
Figure 6. Biopsies duodénales équines prises par endoscopie de qualité inadéquate. ...	32
Figure 7. Schéma expérimental de l'alimentation des juments.	52
Figure 8. Lymphocytes T identifiés par immunohistochimie.....	56
Figure 9. Lymphocytes B identifiés par immunohistochimie.....	56
Figure 10. Identification d'un lymphocyte et d'un éosinophile à l'HEPS.....	57
Figure 11. Biopsies de l'intestin grêle équin colorées à l'AB PAS.....	58
Figure 12. Échelle de gradation de la qualité des biopsies duodénales endoscopiques équines.	61
Figure 13. Qualité des biopsies endoscopiques duodénales de l'étude.	65
Figure 14. Lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran et à l'immunohistochimie.	67
Figure 15. Lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran et à l'immunohistochimie.	68
Figure 16. Nombres de lymphocytes totaux identifiés à l'immunohistochimie.	69
Figure 17. Évaluations quantitatives des lymphocytes T selon les deux diètes.	70
Figure 18. Lymphocytes T identifiés par le CD3.....	71
Figure 19. Évaluations quantitatives des lymphocytes B selon les deux diètes.	72
Figure 20. Lymphocytes B identifiés par le CD20.....	73
Figure 21. Ratio LT/LB	74
Figure 22. Évaluations quantitatives des éosinophiles selon les deux diètes.....	75
Figure 23. Éosinophiles colorés avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran.	76
Figure 24. Biopsies duodénales endoscopiques de chevaux colorées à l'ABPAS.....	78

Liste des sigles

° :	Degré
°C :	Degré Celsius
μL :	Microlitre
g :	Gramme
gMM :	Gramme de matière mouillée
h :	Heure
kg :	Kilogramme
L :	Litre
mg :	Milligramme
min :	Minute
mL :	Millilitre
mm :	Millimètre

Liste des abréviations

AB PAS :	Alcian bleu et Acide périodique de Schiff (<i>Periodic acid Schiff</i>)
AGV :	Acide gras volatil
AINS :	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
BCR :	Récepteur cellulaire du lymphocyte B (<i>B cell receptor</i>)
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
HEPS :	Hématoxyline-éosine-phloxine-safran
HID AB :	Alcian bleu avec de la diamine enrichie en fer (<i>High iron diamine and alcian blue</i>)
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IHC :	Immunohistochimie
IL :	Interleukine
LB :	Lymphocyte B
LT :	Lymphocyte T
MEEM :	Maladie épithéiotropique éosinophile multisystémique
MICI :	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
NF κ B :	Facteur nucléaire kappa B (<i>Nuclear factor-kappa B</i>)
PAS :	Acide périodique de Schiff (<i>Periodic acid Schiff</i>)
PBS :	Saline de phosphate tamponnée (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PNAS :	Polysaccharides non amylacés solubles
TAG :	Test d'absorption de glucose
TCR :	Récepteur cellulaire du lymphocyte T (<i>T cell receptor</i>)
Th :	Lymphocyte T <i>helper</i>
TNF- α :	Facteur de nécrose tumorale alpha (<i>Tumour necrosis factor</i>)

Treg : Lymphocyte T régulateur

vs Versus

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de maîtrise, Dr Daniel Jean, pour sa patience et sa disponibilité. Merci de m'avoir initiée à la recherche, encouragée, conseillée et guidée au cours de ces dernières années. Je vous remercie aussi pour les bourses que vous m'avez données.

J'aimerais remercier mes co-directeurs Dr Pierre Hélié et Dr Jean-Pierre Lavoie pour leur implication et leur intérêt dans le projet.

Dr Hélié, je vous remercie de m'avoir fait part de votre expertise pour l'interprétation des lames ainsi que de m'avoir offert votre temps lorsque j'en avais besoin.

Dr Lavoie, merci beaucoup de m'avoir fait une place dans votre laboratoire ainsi qu'aux lab meetings. Vous m'avez aidé développer mes connaissances et vous m'avez toujours donné de bons conseils.

J'aimerais remercier les fabuleuses assistantes de recherche Amandine Vargas, Hélène Richard et Roxane Boivin pour m'avoir aidé avec les manipulations de laboratoire et pour avoir répondu à mes innombrables questions. Votre patience et votre agréable compagnie au laboratoire m'ont été d'une aide précieuse.

Je remercie Guy Beauchamp pour son aide avec les statistiques

Un merci à Marie-Claude Poirier, Thérèse Cabana et Jean François Pflieger pour les images.

Je voudrais aussi remercier Mme Christine Blondin pour m'avoir aidé et répondu à mes multiples questions et courriels.

Finalement, je veux remercier les membres du jury qui ont accepté de prendre leur temps pour évaluer ce mémoire.

Introduction

L'intestin est continuellement en contact avec des antigènes, ce qui lui confère un rôle important dans l'immunité de l'hôte. La santé intestinale est donc essentielle pour maintenir une défense optimale en présence des antigènes intestinaux pouvant être potentiellement pathogènes. Le système immunitaire de l'intestin est composé de l'immunité innée avec des défenses physiques et cellulaires, ainsi que de l'immunité adaptative majoritairement cellulaire. Normalement, les constituants immunitaires intestinaux ne réagissent pas envers les aliments et le microbiote, mais vont empêcher l'invasion de pathogènes et/ou d'allergènes (1). Un déséquilibre de cette immunité intestinale peut favoriser le développement de maladies infectieuses, inflammatoires ou allergiques. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) forment un groupe de conditions caractérisées par un déséquilibre des cellules immunitaires de la paroi intestinale pouvant atteindre tous les segments du tractus gastro-intestinal. Malgré le fait qu'il y ait peu d'informations sur la pathophysiologie de ces maladies, elles sont principalement dues à une réaction immunologique incontrôlée des voies inflammatoires de la paroi intestinale (2). Chez les chevaux, la présentation clinique des maladies inflammatoires digestives inclut, entre autres, une perte de poids malgré un appétit normal, des coliques récurrentes et/ou la présence de malabsorption. Le diagnostic se confirme en histopathologie suite à l'interprétation de l'infiltration leucocytaire et des changements morphologiques des biopsies digestives. La prise de biopsie duodénale par endoscopie est une méthode de plus en plus pratiquée lors de suspicion de MICI équine puisque c'est une méthode peu invasive où seulement la portion duodénale de l'intestin grêle est accessible (3). Cependant, leur interprétation histologique peut poser un défi diagnostique puisque la démarcation objective entre la normalité et le déséquilibre des cellules immunitaires n'est pas suffisamment définie et étudiée pour l'espèce équine. Plusieurs facteurs, qui sont majoritairement inconnus chez le cheval, peuvent modifier le nombre et/ou le type de ces cellules présentes dans la muqueuse de l'intestin. Une étude réalisée par Moreau et *al.* (2009) a évalué de manière semi-quantitative l'effet de trois diètes communes sur l'histologie de biopsies endoscopiques duodénales et rectales avec une coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran standard chez des chevaux sains (4). Les conclusions de cette étude soulignent la présence de variations histologiques entre

les chevaux, mais celles-ci ne sont pas corrélées aux différentes diètes. Pourtant, de nombreuses études chez les humains et les animaux de laboratoire démontrent un impact direct et/ou indirect de l'alimentation sur l'immunité intestinale (2, 5, 6). L'utilisation d'une coloration non spécifique pour identifier les différentes cellules immunitaires ainsi qu'une méthode d'évaluation semi-quantitative du nombre de ces cellules n'ont peut-être pas été suffisantes pour déceler des différences significatives entre les diètes. C'est pourquoi la présente étude veut permettre, par l'utilisation de l'immunohistochimie, une meilleure caractérisation et identification des lymphocytes de la lamina propria de biopsies endoscopiques duodénales de chevaux sains soumis à deux différentes diètes. De plus, pour mieux caractériser l'impact des deux diètes sur l'histologie du duodénum équin, une évaluation quantitative des éosinophiles et une évaluation qualitative des mucines des cellules caliciformes seront aussi réalisées.

Revue de littérature

1 Anatomie et histologie du tractus gastro-intestinal

L'appareil digestif équin est un long tube débutant à la bouche et se terminant à l'anus. La cavité orale est, entre autres, composée des lèvres, des joues, de la voûte palatine ainsi que du plancher oral avec la langue en son centre. Elle se termine en oropharynx avant de devenir l'œsophage qui est un long tube musculaire situé dorso-latéralement à la trachée de la région cervicale jusque dans la cavité thoracique. L'œsophage quitte la cavité thoracique et pénètre dans la cavité abdominale par l'hiatus œsophagien du diaphragme pour déverser son contenu dans l'estomac. Ce dernier est situé dans la cavité abdominale crâniale gauche, caudalement au foie. Ayant une forme courbée, il se termine dans l'abdomen crânial droit et continue caudalement pour devenir le petit intestin. Le petit intestin est divisé en trois segments, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Ce dernier se prolonge en gros intestin composé du caecum, côlon et rectum. Le tractus gastro-intestinal se termine par l'anus (7) (Figure 1).

Image sans autorisation de diffusion

Figure 1. Anatomie du système gastro-intestinal du cheval de la portion caudale de l'œsophage jusqu'au rectum.

Adaptée de (8).

La lumière du tractus digestif, correspondant au milieu externe, est le site de la digestion alimentaire. Celle-ci se fait de manière enzymatique et/ou microbienne. La digestion

enzymatique se passe surtout au niveau de l'intestin grêle et a essentiellement pour but d'absorber les nutriments de l'alimentation. La digestion microbienne, quant à elle, sert surtout à la fermentation des fibres complexes grâce à la population essentiellement bactérienne qui habite le gros intestin (7). Comme l'intestin est important pour la digestion, une maladie l'endommageant physiquement ou fonctionnellement peut provoquer, entre autres, un syndrome de malabsorption et/ou maldigestion pouvant avoir des répercussions significatives sur la santé de l'animal. Les MICI, caractérisées par une infiltration de leucocytes dans la paroi intestinale, sont les causes les plus communes de malabsorption chez le cheval (9). Les MICI sont diagnostiquées par une évaluation histologique de biopsies intestinales (3).

L'évaluation histologique des tissus digestifs permet la reconnaissance des différents constituants cellulaires de la paroi digestive et des différentes variantes en fonction du site anatomique. Les différents segments du système digestif ont en commun une architecture de base qui est composée de quatre couches, soit la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire externe et la séreuse (Figure 2). Celles-ci vont se modifier et se spécialiser selon les diverses fonctions des segments du tractus digestif. La muqueuse, qui est en contact avec la lumière intestinale, se divise en trois couches, soit l'épithélium, la lamina propria et la *muscularis mucosae*. L'épithélium, à l'interface entre le monde extérieur et l'intérieur du corps, est une couche cellulaire différente pour chaque segment intestinal. Par exemple l'épithélium de l'œsophage est stratifié pavimenteux et non kératinisé tandis que l'épithélium de l'intestin grêle est simple cylindrique d'absorption et de sécrétion. La lamina propria, quant à elle, est composée de tissu conjonctif lâche qui supporte l'épithélium et ancre celui-ci à la *muscularis mucosae*. Dans cette couche, on retrouve des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, des nodules lymphoïdes ainsi que plusieurs leucocytes. La *muscularis mucosae* est une mince couche de fibres musculaires lisses disposées en deux plans d'orientation distincts. La sous-muqueuse, beaucoup plus simple, est composée de tissu conjonctif lâche riche en fibres élastiques, vaisseaux sanguins et lymphatiques et en plexi nerveux. La sous-muqueuse duodénale contient des glandes sécrétrices. La musculaire externe est composée de deux couches de muscles ayant des fibres musculaires dans deux plans différents. Le plan de muscle adjacent à la sous-muqueuse a des fibres musculaires disposées de manières circulaires tandis que les fibres

musculaires de la couche de muscle adjacent à la séreuse sont disposées de manière longitudinale au tube digestif. La séreuse est un épithélium simple pavimenteux qui recouvre un peu de tissu conjonctif lâche (10) (Figure 2).

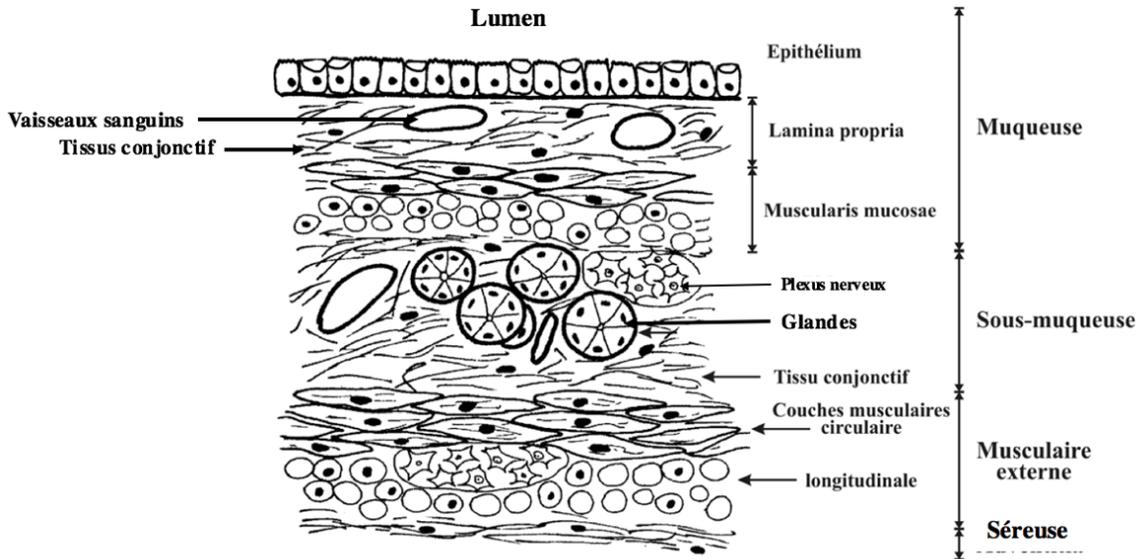


Figure 2. Histologie de base.

Architecture histologique de base de la paroi intestinale qui est composée de 4 couches ; la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire externe et la séreuse. La muqueuse se sous-divise en épithélium qui varie selon le segment digestif, la lamina propria et la *muscularis mucosae*. Adaptée de (11) avec permission.

1.1 Histologie de l'intestin grêle

L'épithélium et la lamina propria de la muqueuse de l'intestin grêle forment des replis nommés villosités (Figure 3). Entre ces villosités, ces deux strates s'invaginent pour former des cryptes dites de Lieberkühn (10). Chez le cheval, l'épithélium de l'intestin grêle est simple et composé majoritairement d'entérocytes de forme cylindrique ayant à leur surface apicale des replis nommés microvillosités. On retrouve également des cellules caliciformes qui excrètent du mucus vers la lumière intestinale. Leur nombre augmente au fur et à mesure que l'on descend vers la base des cryptes de Lieberkühn. À la base de ces cryptes, l'épithélium contient aussi quelques cellules de Paneth au cytoplasme granuleux et acidophile ainsi que des cellules souches (10). Dans l'épithélium, il est aussi possible de retrouver certaines cellules immunitaires tels les

lymphocytes dits intraépithéliaux et quelques rares éosinophiles (12). La lamina propria, quant à elle, est très cellulaire dans les villosités et dans les régions intercryptes. Dans cette couche, on y retrouve beaucoup de fibroblastes et leurs fibres de collagène, des cellules endothéliales et quelques fibres musculaires lisses appartenant à la *muscularis mucosae*. Chez le cheval sain, il est normal d’y retrouver des quantités variables de lymphocytes, de plasmocytes, d’éosinophiles et, plus rarement, de macrophages (10). Leur proportion peut varier d’un endroit à l’autre le long de l’intestin ainsi qu’à l’intérieur même de la lamina propria. Par exemple, chez le cheval, la densité de lymphocytes B, d’éosinophiles et de plasmocytes (surtout ceux qui sécrètent des IgA) est plus élevée dans la lamina propria des villosités que dans la lamina propria qui est entre les cryptes (13). De plus, les éosinophiles augmentent en nombre de l’estomac vers le caecum (12). La sous-muqueuse duodénale, quant à elle, contient beaucoup de glandes, dites de Brünner, qui sécrètent du mucus dans les cryptes de Lieberkühn (14) (Figure 3).

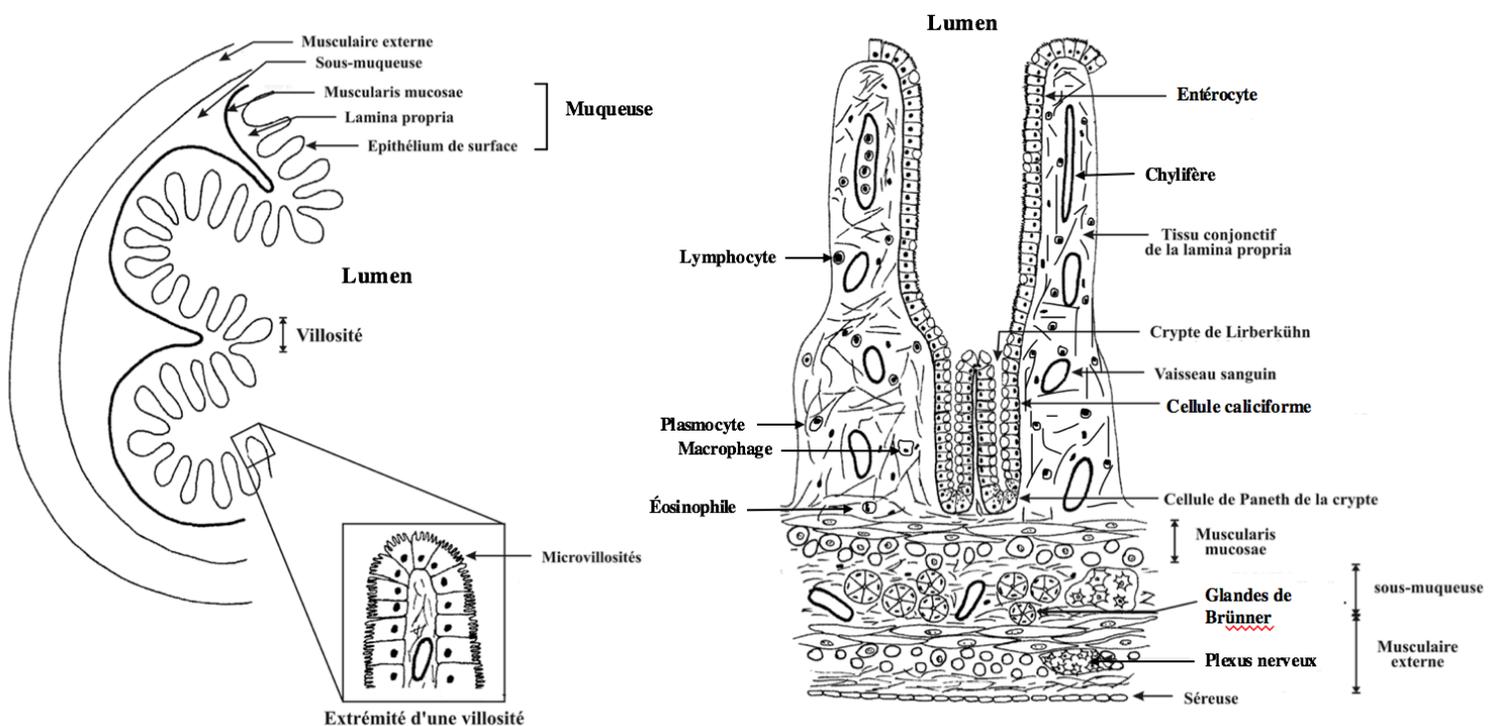


Figure 3. Anatomie et histologie de l'intestin grêle.

À gauche : coupe transversale de l'intestin grêle. L'épithélium de surface est composé d'entérocytes et de cellules caliciformes. L'extrémité d'une villosité est grossie pour montrer les microvillosités de la surface apicale des entérocytes. À droite : Histologie de l'intestin grêle où les diverses composantes de la muqueuse sont illustrées. Adaptée de (11) avec permission.

1.1.1 Effet de l'âge sur l'histologie de la muqueuse intestinale

Des variations de l'histologie intestinale normale sont rapportées chez toutes les espèces animales. Celles-ci peuvent être liées à plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques à l'individu. Parmi ces facteurs, nous retrouvons notamment l'âge. Pour l'espèce humaine, les nouveau-nés ont un épithélium intestinal immature comportant peu de villosités, une sécrétion des composantes des mucines différentes des adultes ainsi qu'une lamina propria hypocellulaire avec un contenu pauvre en lymphocytes et plasmocytes (14). Il est aussi rapporté que les enfants et les personnes âgées ont un ratio de la longueur des villosités sur la longueur des cryptes plus faible que les adultes (14). Pour ce qui est de l'espèce canine, les couches histologiques du jéjunum s'épaississent et une augmentation de la distance entre la base des cryptes et la *muscularis mucosae* est notée avec le vieillissement des individus (15). De plus, il a été démontré par Kleinschmidt et *al.* (2008) qu'il y a une baisse des lymphocytes T et des macrophages ainsi qu'une hausse des immunoglobulines (Ig) A avec le vieillissement chez les chiens (16). On retrouve aussi les effets de ce facteur temporel sur la muqueuse intestinale équine, bien que les études sur le sujet se font rares. Les entérocytes duodénaux des poulains démontrent une vacuolisation importante à leur pôle apical qui serait associé à un rôle d'absorption des nutriments contenus dans le colostrum (17).

1.1.2 Effet des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur l'histologie de la muqueuse intestinale

Certains médicaments peuvent aussi modifier l'histologie intestinale normale. Par exemple, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), qui sont utilisés pour les douleurs arthritiques (18, 19), peuvent engendrer des changements dans la composition des cellules de la lamina propria de l'intestin. Effectivement, une infiltration neutrophilique de la muqueuse intestinale a été documentée chez les humains et les chevaux avec ces traitements (19-21). Les AINS inhibent la phosphorylation oxydative mitochondriale des entérocytes modifiant ainsi leur perméabilité. La muqueuse devient donc directement exposée à plusieurs agresseurs, dont les bactéries intestinales qui ont un effet chimiotactique sur les neutrophiles causant une inflammation non spécifique de la muqueuse intestinale (19, 22). De plus, chez le cheval,

certains AINS ralentissent la réparation de la barrière mucoale intestinale lors de dommages ischémiques. Ceci peut mener à une augmentation de la perméabilité intestinale et à l'infiltration neutrophilique de la muqueuse (20, 21).

1.1.3 Effet de l'alimentation sur l'histologie de la muqueuse intestinale

L'alimentation est un autre facteur pouvant influencer l'histologie du tractus gastro-intestinal. Les glucides, les lipides et les protéines sont les principaux macronutriments fournissant de l'énergie. Il est possible de caractériser les différents types de diètes en variant les proportions de ces macronutriments. Un excès de glucides, qui regroupent entre autres les sucres et les fibres, peut avoir divers effets sur la muqueuse. Par exemple, chez les humains, il a été démontré qu'une diète riche en fibres augmente la prolifération des cellules épithéliales des cryptes du côlon (23). Chez les rats, une diète riche en fibres augmente le nombre de cellules caliciformes dans l'épithélium du petit intestin et augmente la sécrétion de mucine par ces cellules. De plus, ce type de diète favorise la sécrétion de mucine acide rendant le mucus intestinal plus acide et visqueux créant une couche protectrice plus résistante contre l'activité enzymatique bactérienne. Toujours chez les rats, une augmentation de la profondeur des cryptes et un élargissement des villosités sont notées lorsqu'ils sont nourris avec une diète riche en pectine, un polysaccharide non amylacé. Ce phénomène est aussi observé pour le jéjunum et l'iléon des porcs en croissance (23). Contrairement à ces deux espèces, une diète supplémentée en pectine diminue la hauteur des villosités chez le poulet (23). Pour l'espèce canine, on observe une augmentation de lymphocytes T CD8+ dans l'épithélium et dans la lamina propria du petit intestin chez les individus nourris avec une diète contenant des fibres fermentables par l'intestin comme de la pulpe de betterave (24).

Une alimentation riche en matières grasses peut aussi avoir des impacts sur la muqueuse intestinale. Chez les humains, les oméga-3, qui sont des acides gras polyinsaturés, ont un rôle sur la muqueuse intestinale, certains inhibent les cytokines pro-inflammatoires localement tandis que d'autres renforcent la barrière épithéliale en augmentant l'expression des protéines des jonctions serrées de la zona occludens (5). Chez les rats, l'absorption de gras par le petit intestin favorise un mouvement des lymphocytes de la lamina propria vers les nœuds

lymphatiques mésentériques et stimule les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes intra épithéliaux ainsi que les entérocytes à sécréter des cytokines telles que l'IL-6 ou le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (25, 26). De plus, il est aussi démontré qu'une diète riche en acide gras à chaîne longue favorise une sécrétion des IgA de la lamina propria vers le lumen intestinal (26). Toujours chez les rats, l'ingestion d'une diète à base d'huile de palme, un acide gras à courte chaîne, favorise le développement d'une iléite induite ainsi qu'une infiltration augmentée des cellules dendritiques et des cellules de la réponse lymphocytaire Th17 (5).

Les micronutriments, comme les vitamines et les minéraux, ont aussi des effets sur la muqueuse intestinale. Chez les humains, une déficience en vitamine B12 et en acide folique (vitamine B9) peut causer une atrophie villositaire du petit intestin (14). La vitamine D a des effets sur les cellules inflammatoires de la muqueuse intestinale puisque ces cellules ont des récepteurs membranaires pour cette vitamine. Cette vitamine a aussi un effet inhibitoire sur les réponses lymphocytaires des lymphocytes T de type « helper » 1 (Th1) et Th17 tout en stimulant l'expression de certaines cytokines dont l'interleukine (IL) 5 qui est associée à la réponse type Th2. La vitamine D agit aussi sur les lymphocytes B en inhibant leur prolifération, leur différenciation en plasmocytes ainsi qu'en inhibant leur production d'immunoglobuline. De plus, elle renforcerait la barrière épithéliale intestinale en augmentant l'expression des protéines de jonction serrée de la zona occludens (27, 28).

1.1.4 Effet de l'alimentation sur l'histologie de la muqueuse intestinale équine

Lors de MICI équine, la capacité d'absorption du petit intestin est souvent diminuée, un changement d'alimentation devrait donc faire partie du traitement. Il est suggéré d'offrir une diète hautement digestible pour maximiser l'absorption des nutriments en plus d'ajouter un corps gras aux diètes fibreuses pour garder un apport calorifique élevé tout en diminuant le rôle de l'intestin grêle (29). Malgré ce rôle clé de l'alimentation, peu d'études évaluent l'impact de l'alimentation sur l'histologie intestinale des chevaux. Une seule étude publiée démontre que l'épithélium duodénal de poulains nourris au lait de remplacement contenait plus de cellules caliciformes que celui des poulains qui ont ingéré du colostrum (17). Une étude préliminaire à

celle-ci a évalué l'effet de trois diètes communes chez des chevaux sains sur l'histologie de biopsies endoscopiques duodénales et rectales. La première diète était composée de foin de graminée et de moulée sucrée, la seconde de pellets de luzerne et de moulée sucrée et la dernière de foin de graminée et de moulée fibre et gras. Les conclusions de cette étude soulignent une présence de variations histologiques entre les chevaux, mais celles-ci ne sont pas corrélées aux différentes diètes (4).

2 Alimentation des chevaux : généralités

Les chevaux sont des herbivores non ruminants adaptés à manger de grandes quantités de nourriture fibreuse sur une longue période de temps. De nos jours, beaucoup de chevaux domestiqués sont logés dans des écuries où leur diète, composée de fourrage et de concentrés, leur est offerte. La composition de l'alimentation donnée aux chevaux domestiqués dépend de plusieurs facteurs, dont l'âge et l'utilité du cheval ainsi que la disponibilité et le coût des aliments. Les notions de nutrition équine sont importantes à connaître puisqu'un déséquilibre peut mener au développement de diverses maladies (7, 30, 31).

2.1 Foin

Le foin, qui est de l'herbe coupée, séchée et conservée, est un élément important de la diète de base des chevaux logés à l'intérieur. Il fait partie de plusieurs diètes et ses effets bénéfiques sont multiples. Les glucides, telles les fibres, sont le principal macronutriment composant le foin et l'herbe (32). La fermentation des fibres est essentielle aux chevaux, car elle maintient les fonctions digestives normales tout en apportant de l'énergie et en favorisant une population bactérienne saine pour l'animal (7, 30). De plus, cette quantité élevée de fibres demande un temps de mastication plus élevé, ce qui pourrait empêcher le développement de certaines stéréotypies comme le tic à l'air ou à l'appui (33). Par contre, le foin, étant sec, peut être très poussiéreux et devenir une source potentielle d'allergène pouvant induire de l'inflammation des voies respiratoires profondes (32). La composition du foin varie selon l'endroit d'où l'herbe est cultivée. Il sera composé d'un mélange de graminées, comme de la fléole des prés, et de légumineuses, comme de la luzerne. Les valeurs nutritives du foin varient selon le moment de sa coupe. Effectivement, le foin dit de première coupe a une teneur en

protéine plus élevée que le foin de deuxième coupe (34). De plus, les différents stades de maturité peuvent influencer les différentes concentrations intestinales d'acides gras volatils (AGV) produits par la fermentation bactérienne. Par exemple, il a été démontré que le foin coupé en début de saison (juin) produit plus d'acides gras volatils dans les matières fécales que lorsqu'il est coupé à la moitié ou à la fin de la saison (juillet et août) (35). Le foin présenté aux juments de l'étude était du foin de fléole des prés de première coupe.

2.1.1 Fibres alimentaires

Les fibres alimentaires sont des glucides qui sont non digérés par des sécrétions endogènes du petit intestin et donc en sortent quasi indemnes (23, 36). Le classement des fibres varie entre les années, les pays et les espèces animales, mais le classement des fibres selon Santé Canada semble englober la nomenclature qui revient le plus dans la récente littérature. Il y a donc deux grandes classes de fibres, soient les fibres alimentaires et les fibres nouvelles. Les fibres alimentaires sont classées en deux catégories, soient les polysaccharides et les oligosaccharides (36). Les polysaccharides se divisent en trois types ; les polysaccharides amylicés (les amidons), les polysaccharides non amylicés solubles ou insolubles (23). Les amidons et les polysaccharides non amylicés solubles sont les polysaccharides les plus présents dans les plantes (23). Les amidons sont hydrolysés par les enzymes salivaires et pancréatiques. Une partie de ces amidons ne sont pas hydrolysés par les enzymes endogènes, mais le seront par les bactéries intestinales. Ceux-ci sont nommés amidons résistants. Ils sont retrouvés, entre autres, dans les patates crues et les bananes qui ne sont pas mûres (23, 36). Les polysaccharides non amylicés, comme la cellulose ou la pectine, ne sont pas hydrolysés par des enzymes endogènes des non-ruminants et sont donc fermentés par la population bactérienne résidente du grand intestin. La plupart des plantes contiennent un mixte des deux types de polysaccharides non amylicés, mais les proportions varient selon le type de plantes ainsi que sont stade de maturité (23). Les polysaccharides non amylicés solubles sont complètement fermentés contrairement aux fibres insolubles (23). Les fibres nouvelles sont aussi des glucides non digestibles, mais qui ont été modifiés par des moyens physiques, chimiques ou enzymatiques (36). Chez le cheval, le caecum et le côlon sont les organes les plus importants pour la fermentation des fibres qu'ils transforment en énergie (37). La fermentation des fibres produit principalement trois AGV, dont le butyrate, le propionate et l'acétate. Chacun des AGV a des

effets bénéfiques sur le tractus gastro-intestinal à un niveau local et systémique. Chez le cheval, une alimentation riche en fibres favorise la formation d'acétate tandis qu'une alimentation riche en glucides simples non fermentés favorise la formation d'hydrogène, de lactate et de propionate (2). Chez les humains et animaux de laboratoire, les produits de fermentation des fibres favorisent aussi la sélection des bactéries bénéfiques des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* en plus d'avoir des fonctions anti-inflammatoires dont une inhibition du facteur nucléaire kappa B (NFκB) (5). L'AGV butyrate est très étudié chez toutes les espèces pour son effet sur l'épithélium digestif. Effectivement, il aide au développement et à la prolifération des cellules épithéliales en plus de faciliter la formation de lymphocytes T régulateurs (Treg) qui limitent l'inflammation intestinale. Il a aussi un effet sur les protéines de jonctions serrées de la zona occludens de l'épithélium rendant celle-ci plus étanche. Dans le côlon, il se lie directement aux entérocytes, aux macrophages et aux lymphocytes pour prévenir l'inflammation lors de colite expérimentale (5, 23). Chez les rats avec une mucosite induite, un traitement au butyrate améliore l'imperméabilité de l'épithélium et minimise les dommages faits à la muqueuse. Ce traitement a aussi un effet anti-inflammatoire chez les rats et les porcs lors de colite induite. Par contre, chez l'espèce équine un traitement *in vitro* sur un modèle de cellules du côlon dorsal ayant subi un dommage n'a pas eu d'effet réparateur (2). Les fibres, plus particulièrement les insolubles, sont reconnues pour être bénéfiques pour la santé humaine en réduisant le cholestérol et les signes respiratoires chez les enfants asthmatiques (5, 23). Chez les rats avec diète riche en fibres, une production augmentée d'AGV sanguin est notée, ce qui engendre une baisse de la réponse inflammatoire de type Th2 dans le tissu pulmonaire (5). Les chevaux sur une diète riche en fibres ont un index glycémique sanguin et un rythme cardiaque plus bas lors de manipulation comparé à des chevaux sur une diète riche en glucides (31).

2.2 Pellets de luzerne

Les pellets sont souvent composés de foin de légumineuse ou de graminée coupé et compressé pouvant être lié ou non par de la mélasse. Ils peuvent varier en forme et en taille, mais ce sont généralement de petits granules. Cet aliment est très utile pour les chevaux atteints de certains problèmes respiratoires chroniques, tel l'asthme équin, puisqu'il contient généralement moins de poussières irritantes et d'allergènes pour la muqueuse des voies

aériennes (32). Par contre, certaines études démontrent que cette méthode d'alimentation engendrerait des stéréotypies puisque ce sont des aliments qui sont ingérés très rapidement négligeant les impératifs biologiques que sont la mastication et le broutage (33). Une étude en deux parties porte sur les effets d'une diète composée de pellet et d'une autre composée de foin coupé sur divers aspects physiologiques du tractus gastro-intestinal de poneys. Il en sort que pour la diète de pellet, il y a une plus longue rétention du bolus alimentaire associée à une baisse de la vitesse de dégradation des fibres dans le côlon et le caecum. Ce qui fait en sorte que la digestibilité des composantes du foin ne change pas selon la forme de celui-ci (38).

La luzerne est une légumineuse. Elle est donc plus et riche en protéine et en acide oxalique que les graminées. Les acides oxaliques ont un effet négatif puisqu'ils lient le calcium de la plante le rendant indisponible à l'absorption par la muqueuse intestinale. Par contre, la luzerne a une très grande quantité de calcium ce qui contre les effets délétères de ses acides oxaliques. Les chevaux nourris à base de luzerne ne présentent donc pas de déficit calcique. De plus, pour cette espèce, le calcium disponible de la luzerne serait mieux absorbé que le calcium provenant de plantes sans acide oxalique comme la fléole des prés (32). Une diète à base de foin de luzerne augmente le pH de l'estomac ainsi que la production d'AGV, ce qui réduit la sévérité des ulcères gastriques (39). De plus, lorsqu'elle est servie en foin, la consommation volontaire et la biodisponibilité des nutriments sont plus grandes que pour des foins de graminée (40). Par contre, il a été démontré que le foin de luzerne peut être la source de photosensibilisation chez les chevaux (41).

Les pellets présentés aux juments de cette étude étaient composés de luzerne compressée. La seconde diète est donc plus riche en protéines que la première. Peu d'informations existent sur l'effet d'une diète riche en protéines sur la muqueuse intestinale équine. Par contre, il a été démontré qu'une diète plus riche en protéines n'avait pas d'effets sur le temps de passage du bolus alimentaire et n'avait pas d'effets délétères sur le métabolisme. L'excès de protéine qu'apportent les foins de légumineuses, comme la luzerne, est transformé en substrat pour la glycogénèse après la désamination par le foie (40, 42). De plus, les protéines peuvent être

bénéfiques puisque chez les porcs atteints de maladie inflammatoire intestinale induite, une diète supplémentée en tryptophane engendre une baisse de la réponse inflammatoire de type Th1 (5).

2.3 Moulée sucrée

La moulée sucrée est un aliment populaire lorsque le cheval a besoin d'augmenter la portion énergétique de son l'alimentation. Cette méthode est beaucoup utilisée chez les chevaux sportifs ou chez les chevaux qui ont besoin d'un aliment appétant pour stimuler leur appétit (32). Il existe une grande diversité de moulée sur le marché. Une moulée sucrée peut contenir des grains de haute teneur en glucide, comme le maïs, ou une teneur élevée en mélasse. En fait, toute moulée avec ajout de glucides assimilables peut être considérée comme de la moulée sucrée. Cette méthode d'alimentation peut avoir plusieurs effets négatifs sur le microbiote digestif. Effectivement, comme c'est une alimentation riche en glucides, les microorganismes du caecum et du côlon fermentent la surcharge de glucides qui n'a pu être digérée dans l'intestin grêle. Cette fermentation crée un apport significatif d'acide lactique faisant diminuer le pH du caecum et du côlon. Ceci élimine plusieurs bactéries Gram négatif et perturbe la barrière muqueuse pouvant résulter en une dégradation de la muqueuse caecale (7, 30).

3 Contexte clinique de l'utilisation des biopsies intestinales

3.1 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin chez le cheval

Les MICI équinnes forment un groupe de maladies ayant en commun la présence d'infiltration de cellules immunitaires dans la paroi intestinale du petit intestin jusqu'au rectum (3). Il existe six formes de MICI, soit : l'entérite granulomateuse, l'entérocolite lymphoplasmocytaire, la maladie épithéliotropique éosinophile multisystémique (MEEM), l'entérite éosinophile, la colite à éosinophile et l'entérite éosinophile focale idiopathique. Ces infiltrations peuvent provoquer des changements morphologiques et/ou physiologiques de la muqueuse rendant celle-ci inapte à fonctionner. Chez l'animal, les maladies infiltratives du petit intestin se traduisent surtout par un problème de malabsorption et/ou de maldigestion. Le signe clinique le plus commun est la perte de poids qui est plus ou moins importante malgré un appétit normal (9). La malabsorption mène souvent à de l'hypoalbuminémie. Les autres signes cliniques

peuvent inclure de la diarrhée récurrente, des coliques chroniques non sévères, de la dépression et autres signes généraux de problèmes gastro-intestinaux (9, 43). Certaines MICI ont des signes propres à elles comme des lésions de peau pour la maladie épithéliotrope éosinophilique multisystémique (9).

Malgré les nombreuses hypothèses, la cause de ces maladies n'est toujours pas connue, ceci étant vrai autant pour les humains que les chevaux. Outre la susceptibilité génétique, il a été démontré que les patients humains avec une MICI démontrent des changements communs du microbiote. Effectivement, une baisse du microbiote plus particulièrement les phylums Firmicutes, dont spécifiquement *Eubacterium rectale* et *F. prausnitzii* produisant du butyrate, et Bacteroidetes est souvent démontrée. De plus, une augmentation de la famille des Enterobacteriaceae, dont *E. coli*, est souvent observée. Il est aussi démontré que ces patients ont une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale dont une plus faible structure des protéines de jonctions serrées de la zona occludens, une production de mucus altérée ainsi qu'une altération des peptides antimicrobiens sécrétés (2, 5).

Les MICI peuvent se diagnostiquer à partir d'un examen histologique d'une biopsie de pleine épaisseur de l'intestin grêle (3). Les biopsies rectales peuvent aussi présenter des changements histologiques lors de certains cas de MICI. L'évaluation seule de ce type de biopsie n'est donc pas suffisante (29). Mais avant d'en venir aux biopsies, qui sont des techniques pouvant être qualifiées d'invasives, un diagnostic présomptif est souvent fait à partir des signes cliniques, de l'examen général et transrectal ainsi que par les résultats des tests cliniques comme la coprologie, l'hématobiochimie, le test d'absorption au glucose et l'échographie. La coprologie sert surtout à éliminer une cause parasitaire qui engendrerait les mêmes signes cliniques. Par contre, même si les résultats sont négatifs, il est recommandé de traiter l'animal si ce n'est pas déjà fait. Pour l'hématobiochimie, les résultats sont souvent non spécifiques et l'anomalie la plus fréquente est l'hypoalbuminémie (9, 29). Pour diagnostiquer un problème de malabsorption, le test le plus simple d'utilisation et d'interprétation est le test d'absorption au glucose ou au xylose. Le glucose est absorbé par la muqueuse de l'intestin grêle. Si celle-ci présente des anomalies, le

glucose administré ne sera pas absorbé ce qui se reflètera sur la glycémie (43). Pour les chevaux avec un problème significatif de malabsorption, le test d'absorption au glucose a une spécificité de 90-100% et une sensibilité de 40-45%. Il faut donc tenir compte que le test peut être normal même si l'animal est atteint d'une maladie infiltrative intestinale (3). Toutefois, les résultats du test d'absorption au glucose doivent être interprétés avec précautions puisque plusieurs facteurs, comme certaines hormones ou l'âge du patient, peuvent influencer la glycémie. Le test d'absorption au xylose est beaucoup moins sensible, c'est pourquoi il pourrait être plus précis pour l'évaluation de l'absorption intestinale, mais il est plus dispendieux que le glucose. L'utilisation de l'échographe est surtout utile pour observer un épaississement des anses intestinales qui n'aurait pu être palpées à l'examen transrectal ou pour détecter la présence d'un épanchement abdominal (44). L'accumulation de liquide dans cette cavité peut faire suite à de l'hypoprotéïnémie due à la malabsorption. La cytologie de cet épanchement peut mettre en évidence des cellules néoplasiques ou permettre l'élimination de la suspicion de péritonite (9, 43).

L'étude préliminaire à celle-ci a utilisé le test d'absorption au glucose pour établir le statut sain du petit intestin. Chaque jument a eu un test d'absorption au glucose à chaque période de diète. Les valeurs de glycémie obtenues ont été regroupées pour faire une moyenne par diète. Les moyennes ainsi obtenues démontraient que les juments avaient toutes une absorption considérée comme normale (augmentation de plus de 85% de la glycémie de départ 90-120 minutes suivant l'administration) et que les variations entre les moyennes n'étaient pas influencées par les diètes (4).

3.2 Biopsies intestinales de l'intestin grêle

La prise de biopsie intestinale est un outil diagnostique important pour documenter le type de cellules immunitaires présent dans les différentes parties intestinales (muqueuse et sous-muqueuse) et en déterminer la normalité (3, 45). Il existe deux types de biopsies intestinales, soit les biopsies de pleine épaisseur ou endoscopiques. Les biopsies de pleine épaisseur sont prises de manière chirurgicale et comportent toutes les couches de l'intestin, c'est-à-dire de la muqueuse jusqu'à la séreuse. Les biopsies endoscopiques, quant à elles, sont prises de l'intérieur de l'intestin et ne comportent pas toutes les couches. Dépendamment de la taille et de

l'orientation de la pince, elles peuvent être composée de muqueuse et de sous-muqueuse (Figure 4).

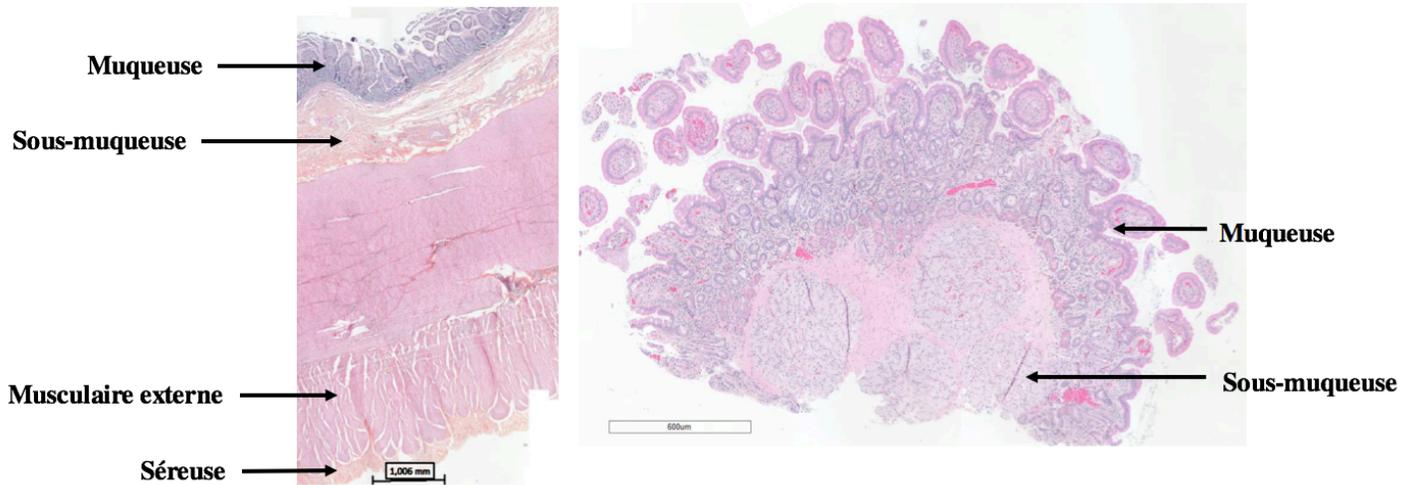


Figure 4. Biopsies duodénales équine.

À gauche, la biopsie pleine épaisseur a été prise par chirurgie ; toutes les couches histologiques sont présentes. À droite, la biopsie a été prise par endoscopie ; seulement la muqueuse et la sous-muqueuse sont présentes. Coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, 10X.

L'évaluation et l'interprétation histologique des biopsies dépendent de la qualité de celles-ci ainsi que des critères établis pour l'espèce d'où provient l'échantillon (45). Les critères de qualité des biopsies duodénales endoscopiques ont surtout été décrits chez les chiens et les chats. Trois critères principaux doivent être évalués soient l'orientation de la biopsie, la profondeur ainsi que le nombre de villosités ou cryptes présentes (46, 47). L'orientation d'une biopsie est idéale lorsque celle-ci est prise à un angle de 90° par rapport à la muqueuse. La coupe histologique de la biopsie doit aussi être transversale au tube digestif pour que les villosités, les cryptes et la muqueuse soient bien visibles au microscope (Figure 5). Les biopsies avec une orientation inadéquate sont souvent axées sur les villosités ou la sous-muqueuse seulement (Figure 6). La biopsie qui a une profondeur idéale démontre des cryptes complètes se rendant jusqu'à la sous-muqueuse sans nécessairement que celle-ci soit complètement présente (Figure 5). Pour ce qui est de la présence des villosités et des cryptes, certains auteurs déterminent un nombre minimal de villosité ou cryptes présentes pour que la biopsie soit considérée adéquate (46, 47). Une étude chez le chien a proposé un nombre de biopsies nécessaires pour établir un diagnostic significatif selon la qualité des biopsies. La conclusion est que plus les biopsies comportent des critères

inadéquats, plus le nombre de biopsies à analyser doit être élevé pour établir un diagnostic adéquat (47). Les biopsies de pleine épaisseur ont tendance à avoir des critères plus adéquats que les biopsies endoscopiques sans toutefois être idéales dans toutes les situations (45).



Figure 5. Biopsie duodénale équine prise par endoscopie de qualité adéquate.

L'architecture est préservée, la coupe est transversale au tube intestinal et il y a présence de plusieurs villosités et cryptes complètes allant jusqu'à la *muscularis mucosae*. Coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, 10X.

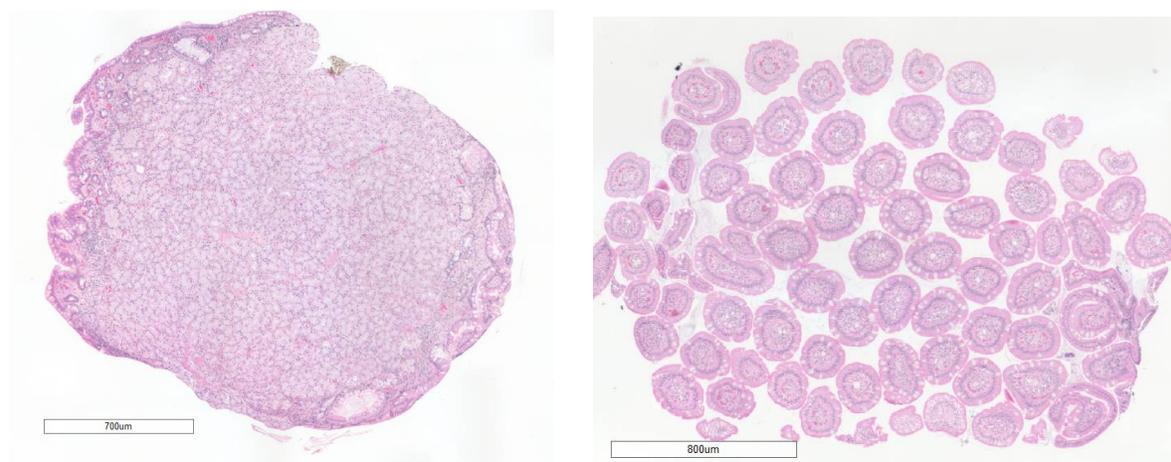


Figure 6. Biopsies duodénales équines prises par endoscopie de qualité inadéquate.

À gauche : la biopsie est axée sur la sous-muqueuse. À droite : présence uniquement du bout des villosités en coupe transversale. Coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, 10X.

3.2.1. Biopsies duodénales par endoscopie

L'endoscope est un long tube optique lumineux couplé à une caméra permettant de visualiser l'intérieur des organes creux. En l'insérant par le naseau du cheval, il se rend jusqu'au duodénum proximal. Une fois dans l'intestin, une pince à biopsie y est insérée pour prélever un morceau de muqueuse constituant la biopsie. Cette procédure est connue pour être moins invasive, plus rapide, moins coûteuse et elle permet de prendre plusieurs échantillons sans affaiblir le patient. Elle est donc idéale pour les patients malades ayant des problèmes de tractus gastro-intestinal (29, 45, 46). De plus, elle permet la visualisation de la muqueuse ce qui rend le prélèvement de lésion visible possible. Mais il faut tenir compte qu'une anomalie visuelle ne signifie pas présence de MICI. Cette technique comporte aussi quelques désavantages, elle ne permet pas d'échantillonner plus loin que le duodénum proximal ou de prendre une biopsie de pleine épaisseur (29). De plus, comme la pince est de petite taille, il est facile de prendre des échantillons inadéquats et lorsque la lésion est dense, la pince n'est souvent pas assez puissante pour en prélever un morceau adéquat (45, 46). Comme la muqueuse est plus épaisse chez les grands animaux, il serait plus difficile de pousser l'endoscope et la pince pour prendre une biopsie (45). Chez l'espèce équine, il y a un manque démontrant la correspondance entre l'interprétation histopathologique d'une biopsie par endoscopie avec l'interprétation d'une biopsie pleine épaisseur. La sensibilité et la spécificité diagnostiques de ce test pour les MICI restent donc à être démontrées (3). Dans l'étude de Boshuizen et *al.* (2018), sur les cinq chevaux présentant des anomalies de la muqueuse visibles à l'œil, seulement deux avaient des lésions histologiques significatives dans les biopsies duodénales. Cette étude a aussi suggéré que les biopsies endoscopiques duodénales ne seraient peut-être pas suffisamment représentatives du petit intestin complet puisque certains chevaux présentaient un test d'absorption au glucose anormal alors que leurs biopsies endoscopiques duodénales étaient normales (3).

3.2.2. Biopsies duodénales par chirurgie

Un des atouts importants de cette technique est la possibilité d'échantillonner certains segments intestinaux que l'endoscope ne peut atteindre. Elle permet aussi la prise d'échantillon de plus grande taille et peut être thérapeutique lorsque la lésion est focale. Par contre, il est impossible de voir directement les lésions à la muqueuse puisque le chirurgien ne voit que la

séreuse. De plus, cette approche comporte un plus haut risque de déhiscence mucoale et plus de morbidités sont répertoriées chez les patients atteints de malabsorption ayant subi ces techniques. D'autre part, elles sont plus coûteuses et nécessitent un temps d'anesthésie plus long (45).

3.3. Évaluation de l'inflammation leucocytaire

Les lames avec l'échantillon de biopsie seront interprétées par un ou une pathologiste pour qu'il ou elle puisse établir un diagnostic ainsi qu'un pronostic dans le but d'offrir un traitement optimal pour le patient. Pour les biopsies intestinales, les pathologistes vont regarder les critères morphologiques, dont la hauteur des villosités, les dommages à l'épithélium, la forme des cryptes, les chylifères ainsi que la présence de fibrose. De plus, ils vont caractériser l'inflammation présente par une évaluation semi-quantitative des cellules immunitaires présentes (46). Ces évaluations sont majoritairement observées sur des biopsies colorées avec des colorants à base d'hématoxyline-éosine qui est une coloration simple et facile à faire et à interpréter.

3.3.1. Immunohistochimie

Pour l'évaluation histologique, deux techniques de coloration, complémentaires l'une de l'autre, sont surtout utilisées. La première, qui est la plus ancienne, est l'utilisation de colorants histologiques qui ont des propriétés biochimiques permettant de colorer les éléments de l'échantillon sur lame. Il existe des colorants non spécifiques qui sont utilisés pour une évaluation histologique globale et pour permettre de visualiser l'architecture des cellules dans le tissu. Le colorant de base le plus connu et utilisé est à base d'hématoxyline-éosine. L'hématoxyline est un colorant basique qui s'attache aux structures acides telles les noyaux des cellules. Tandis que l'éosine est un colorant acide qui colore les composantes cellulaires basiques comme le cytoplasme des cellules et la matrice extracellulaire. Pour cette étude-ci, une coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran a été utilisée. L'ajout de phloxine à l'éosine intensifie la coloration rosée. Le safran, quant à lui, aide à faire ressortir les fibres de collagène en les colorant d'une teinte jaune orangé (48). Il existe aussi des colorants plutôt spécifiques qui peuvent permettre de cibler certains constituants des tissus comme l'alcian bleu qui permet de colorer les substances mucoïdes des tissus (48, 49).

La seconde technique est l'immunomarquage qui utilise les principes d'anticorps-antigène de l'immunologie pour identifier spécifiquement des molécules appartenant à un élément que l'on souhaite observer sur la lame. Cette méthode complète la première lorsque des informations plus spécifiques ont besoin d'être obtenues. Il existe plusieurs procédés d'immunomarquage et pour cette étude-ci, c'est l'immunohistochimie (IHC) qui est utilisée. Pour faire, la lame avec la fine tranche d'échantillon est incubée avec un anticorps ciblant une molécule spécifique à la cellule que l'on souhaite isoler. Cet anticorps ira se lier directement sur la molécule cible. Par la suite, la lame est incubée de nouveau avec un anticorps qui cible le premier anticorps. Le deuxième anticorps se fixe donc au premier. Ce deuxième anticorps est souvent lié à une enzyme qui, lors d'incubation avec un substrat, fera un produit coloré visible au microscope optique. Cette technique permet de caractériser les cellules identifiant la molécule ciblée, de connaître leurs emplacements dans le tissu ainsi que de permettre une évaluation quantitative des cellules marquées. Pour cette étude-ci, deux cellules sont ciblées par l'immunohistochimie soient les lymphocytes T et les lymphocytes B. Pour les lymphocytes T, l'anticorps primaire cible le complexe de protéines CD3 appartenant à un récepteur membranaire. Cet anticorps a été fait chez le rongeur et est monoclonal, c'est-à-dire qu'il est spécifique d'un seul épitope du complexe de protéines CD3. Cet anticorps est dirigé vers un lymphocyte T humain, il est donc dit anti-CD3 humain. L'épitope visé est intracytoplasmique et est hautement conservé entre les espèces, l'anticorps est donc utile pour identifier autant les lymphocytes T humains que ceux des chevaux et plusieurs autres espèces (50). Pour les lymphocytes B, l'anticorps primaire cible des épitopes se trouvant sous la membrane plasmique d'une protéine transmembranaire nommée CD20. L'anticorps a été fait chez le lapin et est polyclonal, c'est-à-dire qu'il y a plusieurs anticorps reconnaissant différents épitopes de la protéine transmembranaire CD20. Il est dirigé vers les lymphocytes B des félins, des canins, des rongeurs ainsi que des humains (51). Ces épitopes sont donc hautement conservés entre les espèces et peuvent aussi être utilisés pour les lymphocytes B équins. Pour les anticorps primaires dirigés contre le CD3 et CD20, la réactivité croisée entre les espèces peut donc se faire. Les résultats des réactions tiennent compte, non seulement, du fonctionnement positif de la réaction à identifier les cellules, mais aussi de

l'intensité du marquage, qui est tout aussi important (52). Ces deux anticorps sont largement utilisés à travers la littérature pour identifier les lymphocytes équins par immunohistochimie.

3.3.1.1. Perte d'antigénicité

Il a été observé que les tissus archivés allant de quelques mois à quelques années avaient un immunomarquage altéré (53). Plusieurs études se sont penchées sur les causes de cette perte de coloration. Il en a été conclu que l'antigénicité des protéines est mieux préservée lorsque le tissu est gardé dans un bloc de paraffine que préservé en tranche mise sur lames, même si celles-ci sont recouvertes de paraffine. L'ajout de protecteurs dans la paraffine endommage encore plus la perte de l'antigénicité. Une étude s'est penchée sur l'effet de la température et de l'humidité dans lesquels sont conservés les blocs de paraffine. Elle en a conclu que plus la température et l'humidité ambiantes sont élevées, plus la perte d'antigénicité est grande. De plus, moins bien le processus de circulation de la biopsie est effectué, plus la température et l'humidité externe ont un impact négatif sur l'immunoréactivité des antigènes. Selon les auteurs, c'est la mauvaise déshydratation de la biopsie lors de la circulation qui est le plus dommageable puisque si le tissu est mal déshydraté, c'est l'eau endogène qui hydrolyse, avec le temps, les protéines (53).

3.3.2. Méthodes de quantification des leucocytes identifiés à l'IHC

La quantification des cellules marquées à l'IHC n'est pas faite de routine lors de l'interprétation d'une lame. Par contre, elle peut s'avérer très utile en recherche, notamment dans le but d'établir des seuils pour distinguer la cellularité normale de l'inflammation. Plusieurs méthodes de quantification des cellules inflammatoires de la lamina propria intestinale sont décrites dans la littérature. La première méthode utilise une échelle (un graticule) qui est montée sur un microscope pour aider à comptabiliser les cellules. Cette méthode est un peu délaissée même si quelques études récentes l'utilisent (54). Selon German et *al.* (1999), où ils quantifient les cellules immunitaires de la lamina propria de chiens sains, un graticule ne permet pas d'avoir une densité exacte de cellules puisqu'on ne peut pas enlever les structures qui ne sont pas de la lamina propria tels les glandes et les vaisseaux sanguins (55). Effectivement, si ces structures ne sont pas enlevées, cela peut sous-estimer les évaluations quantitatives des cellules puisque l'aire sera plus grande pour un même nombre de cellules comptées. La seconde méthode est

celle de la morphométrie à l'aide d'un ordinateur. C'est la méthode la plus utilisée pour comptabiliser les cellules immunitaires de biopsies intestinales chez les animaux. Il s'agit simplement de délimiter une aire de lamina propria et d'y comptabiliser manuellement toutes les cellules d'intérêt. Le résultat est ensuite exprimé en nombre de cellules par aire de lamina propria. C'est une méthode simple à faire, mais qui peut être très longue à appliquer lorsqu'il y a plusieurs biopsies à analyser. La dernière méthode ressemble à la seconde, mais nécessite un programme d'analyse d'image microscopique. Comme la seconde méthode, il faut tout d'abord délimiter une aire d'intérêt de lamina propria. Par la suite, il est possible d'améliorer le contraste entre la coloration des cellules marquées et le reste du tissu. Enfin, il faut programmer une méthode de comptage automatique basée sur l'aire d'une cellule d'intérêt. Le résultat est donné en pourcentage de coloration à l'IHC dans la lamina propria (aire de cellule colorée/aire de lamina propria d'intérêt). Cette méthode a l'avantage d'être plus rapide et permet d'analyser un plus grand nombre de biopsies que la précédente. Par contre, elle ne tient pas compte l'aspect morphologique d'une cellule qui peut changer beaucoup selon la coupe du tissu. Dans ce cas, le compte peut être artificiellement augmenté. Il est donc important de valider au préalable cette méthode avec des comptes manuels pour une cellule d'intérêt. Pour des raisons pratiques, c'est la seconde méthode qui a été utilisée pour ce projet.

4 Immunité intestinale

4.1 Généralités

La muqueuse digestive est constamment exposée aux divers antigènes et microorganismes présents dans le tractus digestif. Par conséquent, l'intestin se doit de posséder un système de défense complet et efficace pour empêcher l'invasion d'agents infectieux. L'immunité de l'hôte se divise en immunité innée et en immunité adaptative. L'immunité innée de l'intestin se divise en défense physique et en défense cellulaire (1, 56). Pour la défense physique, on retrouve tout d'abord l'épithélium de la muqueuse. Celui-ci est composé d'entérocytes, de cellules caliciformes, des cellules basales et des cellules de Paneth. Outre l'absorption des nutriments, les entérocytes ont un rôle important dans la perméabilité de l'épithélium grâce à leurs protéines de jonctions intercellulaires. Ces protéines maintiennent les

entérocytes ensemble pour empêcher les bactéries et molécules de passer entre elles. Ces protéines sont organisées en complexe apical jonctionnel qui est composé des jonctions serrées (zona occludens) et des jonctions adhérentes (zona adherens). Un changement dans l'expression de ces protéines rendant l'épithélium perméable est associé à plusieurs maladies inflammatoires, dont les MICI (2). Les cellules caliciformes sont responsables de la sécrétion du mucus qui couvre l'épithélium. Le mucus contient, entre autres, des mucines, des enzymes, des peptides antimicrobiens, des électrolytes et des immunoglobulines qui ont tous un rôle dans la résistance aux pathogènes. Les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes intestinales, sont responsables de la sécrétion de lysozymes ayant une capacité bactéricide. Une particularité de l'espèce équine est la présence d'un nombre élevé de cellules de Paneth (57). Une fois les barrières physiques de la muqueuse passées, c'est la défense cellulaire de l'immunité innée qui s'oppose aux pathogènes invasifs. Celle-ci met en place une défense rapide et non spécifique (1, 58). Elle est dite non spécifique puisque les récepteurs membranaires de ces cellules reconnaissent des patrons généraux se retrouvant sur une majorité de microorganismes pouvant être pathogènes ou non (58, 59). Les cellules de l'immunité innée proviennent des cellules pluripotentes de la moelle osseuse (60). Ces cellules sont les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et les cellules lymphoïdes innées (1, 60, 61). Certaines de ces cellules sont résidentes de la muqueuse intestinale et attirent leurs semblables à l'aide de cytokines et chimiokines (1, 60). Les cytokines et cellules de l'immunité innée sont aussi nécessaires pour activer le deuxième type d'immunité, soit l'immunité adaptative (59, 60). L'immunité adaptative a l'avantage de pouvoir reconnaître et détruire un pathogène à l'aide de marqueur spécifique à celui-ci. Elle a aussi la capacité de développer une mémoire cellulaire faisant en sorte qu'une réponse plus rapide et efficace se met en place suite à une seconde rencontre avec le même pathogène (58). Les cellules faisant partie de l'immunité adaptative proviennent de la lignée lymphoïde des cellules pluripotentes de la moelle osseuse. Ces cellules sont les lymphocytes T et B ainsi que les plasmocytes, stade ultérieur des lymphocytes B, sécrétant des anticorps (60). Il est important de ne pas confondre les cellules lymphoïdes innées avec les lymphocytes. Les cellules lymphoïdes innées ont une morphologie de type lymphoïde, n'ont pas de marqueurs phénotypiques des cellules de la lignée myéloïde, mais font partie de l'immunité innée (61).

4.2 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes font partie de l'épithélium et leur nombre varie en fonction du segment du tractus gastro-intestinal. Ces cellules sont formées à la base des cryptes et se déplacent vers le haut des villosités gagnant ainsi en maturité tout au long du trajet. Elles terminent leur cycle de vie en se détachant de la membrane basale vers la lumière intestinale. Ces cellules sont polarisées et sécrètent par leur pôle apical des mucines vers la lumière intestinale. Ces mucines sont, entre autres, responsables de la viscosité et de l'état d'hydratation du mucus protecteur de l'épithélium (62). Dues à leurs structures moléculaires, les mucines sont hétérogènes leur conférant ainsi différentes propriétés. Elles peuvent être classées en trois catégories ; les mucines neutres, les mucines acides sulfatés et les mucines acides non sulfatés. Le type de mucines sécrétées varie en fonction du segment intestinal ainsi que selon l'axe villosité-crypte puisque les cellules caliciformes immatures sécrètent des mucines neutres et, au fur et à mesure qu'elles mûrissent, ce sont des mucines acides qui sont sécrétées. Outre le stade de maturité, plusieurs facteurs influencent le type de mucine sécrétée comme l'alimentation et la maladie. Entre autres, il est démontré que chez les rats recevant une diète élevée en fibres, l'épithélium de l'intestin grêle comporte plus de cellules caliciformes en plus d'avoir une augmentation de 210% des sécrétions de mucines comparées aux rats avec une diète sans fibres. Ce phénomène a aussi été démontré chez l'humain et le porc. Ceci serait dû, entre autres, à une réponse mécanique de l'épithélium suite à l'effet abrasif des fibres sur le mucus. De plus, la fermentation de ces fibres produit des acides gras volatils qui ont aussi un effet sur les mucines et les cellules caliciformes. L'apport de fibres dans la diète engendre aussi une sécrétion de mucines acides, ce qui augmente le potentiel de résistance à l'activité enzymatique bactérienne. Les mucines sont aussi influencées par le microbiote de l'intestin qui, à son tour, est modulé par l'ingestion d'aliments (23). La colite ulcéraire, une MICI rencontrée chez l'humain, est caractérisée par une baisse des mucines acides sulfatées et une augmentation des mucines acides non sulfatées dans les cellules caliciformes du côlon (63). Pour différencier le type de mucine contenu dans les cellules caliciformes, plusieurs techniques sont possibles. On retrouve parmi les plus simples et efficaces la coloration associant l'alcian bleu avec de l'acide périodique de Schiff (AB PAS). L'alcian bleu colore en bleu les mucines acides tandis que le PAS colore les

mucines neutres en rose (64). Pour différencier les deux types de mucines acides avec une coloration, l'alcian bleu avec de la diamine enrichie en fer peut être utilisée (63).

4.3 Lymphocytes

Les lymphocytes matures sont de petites cellules avec un noyau très rond, foncé et contenant peu de cytoplasme (49). Ils sont retrouvés dans le sang, dans la lymphe ainsi que dans les muqueuses de plusieurs organes. Dans le petit intestin équin sain, c'est la cellule immunitaire la plus nombreuse de la lamina propria (13). Les lymphocytes sont les cellules centrales de l'immunité adaptative puisqu'elles peuvent reconnaître des antigènes et engendrer une réponse spécifique contre ceux-ci. Ils peuvent être classés en deux catégories, soit les lymphocytes T et les lymphocytes B qui se divisent chacun en différentes sous-populations (60). Les lymphocytes T ont une panoplie de rôles différents qui servent surtout à réguler et diriger la réponse de l'immunité adaptative. Les lymphocytes B, quant à eux, ont surtout pour fonction la sécrétion d'anticorps dirigés contre un antigène (65). Ayant donc des rôles différents, la gestion d'une anomalie immunitaire impliquant les lymphocytes peut être différente selon le type qui est en jeu. Comme la coloration HEPS standard ne permet pas de différencier les lymphocytes T des lymphocytes B, l'immunomarquage devient donc essentiel pour mieux les caractériser.

4.3.1. Lymphocyte T

Les lymphocytes qui sont générés dans la moelle osseuse et qui migrent jusqu'au thymus pour continuer le processus de maturation sont nommés lymphocytes T. Une fois matures, ces cellules quittent le thymus par la circulation sanguine et vont se retrouver dans les nœuds lymphatiques. Ces lymphocytes T dis naïfs, puisqu'ils n'ont pas rencontré d'antigène, se déplacent par la circulation sanguine constamment d'un nœud lymphatique à un autre (49). C'est dans un nœud lymphatique que les cellules présentatrices d'antigène ayant capté et traité un antigène le présente aux récepteurs des lymphocytes T naïfs qui passent par là. Le récepteur du lymphocyte T qui reconnaît l'antigène se nomme TCR pour « T-cell receptor ». Ce récepteur existe sous deux formes qui séparent les lymphocytes T en deux groupes. Il y a les lymphocytes T avec un « T-cell receptor » composé de chaînes glycopeptidiques α/β et les lymphocytes T avec un récepteur de chaînes glycopeptidiques γ/δ (66). Le « T-cell receptor » α/β est

accompagné d'un complexe de protéine appelé CD3 qui est lui-même accompagné d'une glycoprotéine, CD4 ou CD8, qui stabilise l'interaction entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène (67). Une fois cette interaction stabilisée, le lymphocyte T s'active, se multiplie et envoie ses clones au site de l'infection. Une petite partie de ces clones serviront à la mémoire cellulaire qui caractérise l'immunité adaptative. Les lymphocytes T sont facilement identifiables en immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre des molécules de surface. Le choix de l'anticorps dépend de la population de lymphocyte T à isoler.

4.3.1.1 Molécules de surface

Il est possible d'identifier tous les lymphocytes T par le complexe CD3 du « T-cell receptor » α/β composé de 3 types de polypeptides différents, soit deux ϵ , un δ et un γ (67). Suite à une liaison du « T-cell receptor » par un ligand, ces protéines servent à transmettre le message vers l'intérieur de la cellule (66). C'est une molécule de surface avec une petite portion intracytoplasmique facile à identifier aidant à distinguer les lymphocytes T des lymphocytes B puisque ceux-ci en sont totalement dépourvus. Le CD3 est aussi la molécule la plus utilisée en immunohistochimie pour isoler les lymphocytes toutes espèces confondues. Pour l'espèce équine, une seule étude publiée quantifie les lymphocytes T de la muqueuse intestinale saine. Elle rapporte que, pour le jéjunum, les lymphocytes T sont plus nombreux que les lymphocytes B et qu'il y a une plus grande concentration de ces cellules dans la lamina propria des villosités que dans la lamina propria des cryptes (13). Ceci est aussi démontré chez les espèces canine et féline (55, 68).

Il est aussi possible de caractériser les populations de lymphocyte T en ciblant les molécules CD4 et CD8 qui sont presque toujours mutuellement exclusives. La variation des réponses inflammatoires est due au fait qu'il y existe différentes sous-populations de lymphocyte T. La première grande sous-population est composée des lymphocytes T CD4+. Ces lymphocytes répondent à une cellule présentatrice d'antigène qui présente un antigène traité à l'aide de son récepteur nommé complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (69). Les lymphocytes T CD4 sont appelés « helper » (Th) car, suite à leur activation, elles ont comme fonction d'aider d'autres cellules inflammatoires par les cytokines qu'elles sécrètent. Il est possible de

catégoriser les lymphocytes Th en fonction des cytokines sécrétées par ceux-ci. Les deux premiers types à être reconnus dans les années 1980 sont les Th1 et Th2. Les lymphocytes Th1 produisent plusieurs cytokines, dont l'interféron (IFN) γ et l'interleukine (IL) - 2, qui favorisent une réponse immunitaire cellulaire par l'activation des lymphocytes T CD8+ et des macrophages (70). Les lymphocytes Th2, quant à eux, produisent une série de cytokines, dont les IL-4 et IL-5, qui favorisent une réponse immunitaire humorale en activant les lymphocytes B qui sécrèteront différents anticorps spécifiques (59, 70). Depuis, plusieurs autres types de lymphocytes Th ont été découverts. En outre, le lymphocyte Th17 dont le rôle dans les processus immunitaires de l'intestin est de plus en plus étudié (69). Dans un contexte d'homéostasie, les lymphocytes Th17 de la lamina propria de l'intestin grêle sont régulés par le microbiote et les antigènes alimentaires. Ils peuvent sécréter des cytokines pro et anti-inflammatoires (71). Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées sont, entre autres, l'IL-17, l'IL-21 et l'IL-22. Lorsque l'IL-17 se fixe sur son récepteur, il déclenche une cascade de réaction menant au recrutement des neutrophiles produisant une inflammation locale. Comme il existe des régulations croisées entre les différentes réponses inflammatoires des lymphocytes T, les maladies sont souvent caractérisées par un profil de cytokines de lymphocyte Th dominant (69). Il a été démontré que les patients atteints de maladie de Crohn, une MICI humaine, ont un profil Th1 et Th17 due à la présence de l'IL-12, l'IL-17a et l'IFN γ (5). Une étude récente a démontré que dans les biopsies rectales de rats et d'humains avec une MICI, l'expression des gènes du profil Th17 est augmentée (2). Chez l'espèce équine, une infiltration augmentée de lymphocyte T est observée lors de MICI, mais le type n'est pas connu. Une étude s'est donc penchée sur l'expression de gènes présents dans les biopsies rectales de chevaux démontrant des signes d'inflammation. Les auteurs ont démontré que ces biopsies rectales avaient une augmentation de l'expression de l'ARNm IL-17a, ce qui était confirmé par la présence de neutrophiles dans la lamina propria. La présence de neutrophile est considérée comme un facteur de la perpétuation de l'inflammation dans les MICI humaines. De plus, chez le cheval, le rôle inflammatoire de l'IL-17 a été démontré pour certaines maladies pulmonaires inflammatoires ainsi que les uvéites récurrentes (72-74).

La deuxième grande sous-population de lymphocytes T est composée des lymphocytes T CD8+. Les lymphocytes CD8+ peuvent être activés directement par des cellules présentatrices d'antigène ou par les cytokines des lymphocytes Th1 (70). Les lymphocytes T CD8+ répondent à une cellule présentatrice d'antigène qui présente un antigène traité à l'aide de son récepteur complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1. Une fois activés, les lymphocytes T CD8+ se lient à la cellule cible et libèrent leur contenu cytoplasmique granulaire. Ceci provoque la lyse de la cellule cible selon plusieurs mécanismes. C'est la raison pour laquelle les lymphocytes T CD8+ sont dits cytotoxiques (67).

4.3.2. Lymphocyte B

Provenant de la moelle osseuse, les lymphocytes B matures, mais naïfs migrent et se regroupent en follicules dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate ou les nœuds lymphatiques (75). À ce stade-ci, les immunoglobulines (Ig) D et M se retrouvent ancrés dans sa membrane plasmique (65). L'activation d'un lymphocyte B par un antigène peut se dérouler selon deux mécanismes. Le premier est une activation directe entre un antigène et le récepteur cellulaire du lymphocyte B nommé BCR pour « B-cell receptor ». Le deuxième mécanisme, le plus fréquent des deux, se fait à l'aide d'un lymphocyte T. Tout d'abord, le lymphocyte B doit présenter un antigène à un lymphocyte Th qui a déjà rencontré ce même antigène. En retour, ce dernier lui renvoie un signal chimique qui activera le lymphocyte B et qui se transformera en lymphoblaste. Celui-ci a deux avenues possibles. Premièrement, il peut se différencier en plasmocyte de courte vie qui ne sécrète que des IgM. Deuxièmement, il peut devenir un centroblaste et migrer au centre germinatif pour poursuivre le processus de sélection. Ce follicule deviendra alors un follicule secondaire avec un centre germinatif où se multiplient les centroblastes. C'est dans ce centre que le centroblaste rencontre un autre lymphocyte T qui, à l'aide de cytokines, font changer les Ig de surface. Les IgM et IgD membranaires sont remplacés par des IgA, IgG ou IgE. Ceci est communément appelé un « class switch ». Puis, en fonction des interactions moléculaires entre les deux lymphocytes, le centroblaste peut proliférer en lymphocytes B mémoires ou se transformer en plasmocytes de longue vie (65, 75). L'étude de Packer *et al.* (2005) rapporte un faible nombre de lymphocytes B résidents dans la lamina propria du jéjunum de chevaux sains et ils sont majoritairement présents dans la lamina propria des cryptes (13). C'est un phénomène qui est aussi observé chez l'espèce canine (55). Plusieurs

molécules de surface peuvent être ciblées par les anticorps dont les plus spécifiques sont les molécules CD79 et CD20 (76).

4.3.2.1. Molécules de surface

La molécule membranaire CD79 est composée de deux chaînes, soit CD79a et CD79b. Elle est exprimée sur la membrane plasmique à un stade immature du lymphocyte B jusqu'à sa maturité restant même parfois au stade de plasmocyte (65, 76). CD79 est associée au « B-cell receptor » et aide à la transmission du message vers l'intérieur de la cellule. L'anticorps qui fonctionne le mieux en immunohistochimie pour les tissus équins est un anticorps dirigé contre un épitope sur la chaîne CD79a de la molécule (76). La molécule membranaire CD20, quant à elle, est essentiellement intracellulaire et seulement une petite portion est retrouvée à l'extérieur de la cellule. Elle sert à la régulation transmembranaire du calcium ainsi qu'à la progression du cycle de maturation cellulaire (77, 78). Elle est présente tout au long de la vie de du lymphocyte B et ne se retrouve pas sur les plasmocytes (78). L'anticorps, reconnaissant la molécule, est dirigé vers un épitope se trouvant sous la membrane plasmique (77). Ces deux antigènes, CD20 et CD79a, sont utilisés dans la littérature pour marquer les lymphocytes B. La molécule CD79 apparaît plus tôt dans le développement du lymphocyte B et donc peut les marquer à un stade plus primitif dans la moelle osseuse (65). Par contre, elle peut aussi être exprimée sur les plasmocytes, où la molécule CD20 ne se retrouve pas (76, 77). Toutefois, quelques études ont démontré qu'un petit nombre de lymphocytes T expriment aussi la molécule CD20, mais en moindre quantité que les lymphocytes B (79, 80). Chez les chevaux, l'anticorps spécifique au CD20 est le plus souvent utilisé, surtout lors d'identification histologique de lymphome et lors de quantification de lymphocytes B (51, 81, 82).

4.4. Éosinophiles

Les éosinophiles sont des granulocytes provenant de la lignée myéloïde des cellules pluripotentes de la moelle osseuse (60). Ces cellules se retrouvent en plus grande concentration dans le sang, mais peuvent aussi résider dans les muqueuses de plusieurs organes (49). Les éosinophiles sont en plus grand nombre dans la muqueuse gastro-intestinale normale que dans toute autre muqueuse saine. Chez les équins, la densité d'éosinophile intestinal est plus grande que pour les autres espèces (12). Les muqueuses jéjunales et coloniques équines surexpriment

l'ARNm eotaxin-1, qui est le régulateur spécifique aux éosinophiles, par rapport aux autres tissus non lymphoïdes tels la peau, les poumons, les reins et le foie chez un individu (83). Pour l'espèce équine, deux études quantifient les éosinophiles de la lamina propria de biopsie pleine épaisseur provenant de chevaux sains. La première est celle de Packer *et al.* (2005) qui étudie les cellules inflammatoires du jéjunum (13). La seconde est celle Rötting *et al.* (2008) qui étudie les éosinophiles sur les segments intestinaux allant de l'estomac jusqu'au rectum (12). Les deux études démontrent un nombre plus élevé d'éosinophiles dans la lamina propria des cryptes par comparaison à celle des villosités. (12, 13). Ce résultat est aussi démontré pour l'espèce canine (55). Les éosinophiles peuvent aussi être attirés dans la muqueuse intestinale par différents signaux chimiques provenant d'un microorganisme, d'un tissu endommagé ou des autres cellules immunitaires lors d'une infection (84). Une augmentation de ces cellules indique souvent une infection parasitaire ou une réaction allergique (12, 84). Chez les chevaux, une infiltration de la muqueuse du tractus digestif par ces cellules caractérise l'entérite éosinophilique (12). Les éosinophiles peuvent phagocyter ou libérer des enzymes qui vont dégrader le microbe envahisseur (60, 84). Ces cellules ont aussi un rôle fonctionnel pour le maintien de l'homéostasie de l'immunité intestinale. Effectivement, il a été démontré que chez les souris déficientes en éosinophiles, le nombre de plasmocytes sécrétant des IgA résidant dans la muqueuse de l'intestin grêle ainsi que le nombre de ces cellules sécrétées étaient significativement plus bas que chez les souris normales, surtout lors d'inflammation intestinale (85, 86). Les éosinophiles ont un noyau bilobé et contiennent une multitude de granules dans leur cytoplasme (49). Les granules les plus abondantes contiennent chacune une protéine cristalloïde très basique qui attire les colorants acides comme l'éosine (12, 84). Avec la coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, la cellule a donc une apparence ronde constellée de granules éosinophiles visibles au microscope optique, ceux-ci sont si nombreux qu'ils couvrent le noyau. Par contre, chez certaines espèces, il est parfois nécessaire d'utiliser une coloration spécifique pour les éosinophiles, car à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, il est possible de les confondre avec les neutrophiles. Selon une étude comparant cinq colorations différentes sur les éosinophiles provenant de tissus pulmonaires murins, les auteurs en sont venus à la conclusion que le colorant « Sirius Red » était plus adéquat, car il offre un bon contraste entre le fond et l'éosinophile, il est abordable en temps et en argent en plus d'être très

spécifique (87). Selon quelques études d'éosinophiles faites chez les équins, la coloration de Luna est la plus utilisée même si l'hématoxylin-éosine-phloxine-safran démarque suffisamment ces cellules (12).

4.5 Microbiote, immunité et alimentation

On ne peut parler de santé intestinale, sans parler de microbiote intestinal. Celui-ci est présent chez tous les animaux et comprend les bactéries, les virus, les fungi et les protozoaires qui habitent l'intestin (88). Un microbiote en santé a une relation symbiotique avec la muqueuse intestinale tout au long de la vie de l'animal. Il aide le tractus gastro-intestinal en formant une barrière physique contre les pathogènes, en métabolisant des substrats non digérés par la muqueuse, comme les fibres, et en produisant des métabolites nourrissant les entérocytes. De plus, il éduque le système immunitaire en induisant le recrutement des cellules pro et anti-inflammatoires comme les lymphocytes Th1, Th17 et surtout les Treg qui forment la tolérance immunitaire face aux antigènes (5). La quantité et la proportion des microorganismes du microbiote sont spécifiques à l'espèce et varient selon plusieurs facteurs comme l'âge, la localisation dans l'intestin ainsi que l'alimentation. Les bactéries de l'intestin grêle habitent le lumen, la couche de mucus ainsi que la muqueuse (23). Chez les équins, le microbiote change selon l'âge où une baisse de la population microbienne chez les chevaux âgés est démontrée. Ceci est probablement dû aux changements physiologiques qui viennent avec l'âge comme le ralentissement du transit intestinal. Les poulains, quant à eux, ont une flore complexe qui change jusqu'au stade adulte. Le microbiote équin change aussi selon la condition corporelle et le sexe des individus. Le duodénum équin contient $2,90 \times 10^6$ bactéries par gramme de matières mouillées (gMM) provenant du lumen, le jéjunum contient $29,0 \times 10^6$ bactéries/gMM et l'iléum contient $38,4 \times 10^6$ bactéries/gMM (89). Les Firmicutes et Bacteroidetes sont les phylums les plus abondants et prédominants de ce microbiote (37). Les fibres alimentaires sont les substrats de base pour les bactéries du microbiote intestinal, particulièrement pour les animaux non ruminants (23). Les bactéries, surtout les résidents du côlon et du caecum, fermentent ces fibres et produisent les acides gras volatils que le cheval utilise comme source d'énergie (37, 90).

Les effets du microbiote sur le tractus gastro-intestinal sont multiples. Il a été démontré que les souris sans germes intestinaux ont une baisse de cellularité et un système immunitaire moins performant dans la lamina propria du petit intestin. Elles ont aussi moins de plasmocytes (surtout ceux qui sécrètent des IgA), de lymphocytes intraépithéliaux et ont des plaques de Peyer plus petites (71). Un changement alimentaire, une inflammation ou des antibiotiques peuvent perturber les bactéries commensales de l'intestin et ainsi augmenter le risque de colonisation et d'expansion par les pathogènes. Il est possible d'observer une modification du microbiote 24 h suivant un changement alimentaire. Une diète équilibrée, comportant des fibres alimentaires, engendre une balance homéostatique de la muqueuse intestinale permettant ainsi des interactions régulées entre l'épithélium et le microbiote. Un déséquilibre peut favoriser les bactéries pathogènes qui vont induire des cellules pro-inflammatoires dans la muqueuse. Si la situation perdure, une inflammation incontrôlée peut s'établir et créer des dommages à la muqueuse. Par exemple, il est démontré qu'une diète riche en matières grasses et en sucrose diminue la diversité du microbiote ce qui peut affaiblir la barrière protectrice bactérienne et ainsi favoriser l'augmentation du nombre de pathogènes opportunistes. Chez les rats, ce phénomène mène à une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi qu'à une présence augmentée des médiateurs pro-inflammatoires dans le côlon (5).

De plus en plus de recherches font le lien entre les maladies inflammatoires et une dysbiose du microbiote intestinal. Par exemple, il est démontré qu'il y a des changements dans les phylums et les genres de bactéries chez les humains, les chiens, les chats et les animaux de laboratoire avec une MICI (88). L'étiologie des MICI est inconnue, mais les évidences pointent vers une action du microbiote puisque celui-ci peut soutenir ou engendrer une réponse immunitaire pouvant endommager les tissus chez les individus génétiquement susceptibles (2). Pour l'espèce équine, un changement du microbiote augmente les risques de maladies. Par exemple, un surplus de glucides va être fermenté en lactate dans le gros intestin. L'excès de lactate peut causer une baisse du pH pouvant mener à une acidose locale qui endommage l'épithélium et une acidose systémique pouvant mener à de la fourbure (7). Plus d'études sont nécessaires pour connaître l'impact de l'alimentation sur le microbiote intestinal et son rôle dans le développement et la

progression des maladies inflammatoires équinés. Avec ces informations, il sera sans doute plus facile de prévenir et traiter certaines maladies.

Résumé

Les chevaux ont un système digestif élaboré et leur microbiote intestinal est nécessaire pour la digestion de fibres non digestibles qui se trouve à être une source importante d'énergie (7). La domestication intérieure des chevaux a entraîné un changement dans leur mode d'alimentation ; ils sont passés du constant broutage d'herbe à la possibilité d'une variété de diètes offertes à des périodes restreintes où le foin sert souvent d'élément de base (7, 33). Étant constamment exposée aux aliments et microorganismes, la santé intestinale est essentielle pour maintenir une défense optimale contre les antigènes pouvant être potentiellement pathogènes. Le système immunitaire de l'intestin est composé de l'immunité innée avec des défenses physiques et cellulaires, ainsi que de l'immunité adaptative majoritairement cellulaire (1, 14). Un déséquilibre de cette immunité intestinale peut favoriser le développement de maladies infectieuses, inflammatoires ou allergiques. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin forment un groupe de conditions caractérisées par un déséquilibre dans le type et/ou le nombre des leucocytes de la paroi intestinale pouvant atteindre tous les segments du tractus gastro-intestinal. La prise de biopsie duodénale par endoscopie est une méthode de choix pour le diagnostic de MICI équine (3). Cependant, l'interprétation histologique de la plupart des MICI peut poser un défi puisque la démarcation objective entre la normalité et le déséquilibre des cellules immunitaires n'est pas suffisamment définie pour l'espèce équine. L'étude de facteur modifiant l'immunité cellulaire normale de l'intestin, comme les différents régimes alimentaires, permettra de mieux caractériser la population leucocytaire normale et ainsi préciser cette démarcation. Une étude réalisée par Moreau et *al.* (2009) a évalué de manière semi-quantitative l'effet de trois diètes communes sur l'histologie de biopsies endoscopiques duodénales et rectales avec une coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran standard chez des chevaux sains. La première diète était riche en fibres, la seconde riche en protéines et la troisième riche en matières grasses. Les résultats de cette étude démontrent qu'il existe une variation histologique entre les chevaux, mais que celle-ci n'est pas corrélée aux diètes. L'étude démontre aussi que la moyenne de la glycémie des juments n'était pas influencée par les diètes offertes (4). L'utilisation d'une coloration non spécifique pour identifier les différentes cellules immunitaires ainsi qu'une méthode d'évaluation semi-quantitative du nombre de ces cellules

n'ont peut-être pas été suffisantes pour déceler des différences significatives entre les diètes. C'est pourquoi la présente étude veut permettre, par l'utilisation de l'immunohistochimie, une meilleure identification des lymphocytes. De plus, pour mieux caractériser l'impact des deux diètes sur l'histologie du duodénum équin, une évaluation quantitative des lymphocytes et des éosinophiles ainsi qu'une évaluation qualitative des mucines des cellules caliciformes seront réalisées.

Hypothèses et objectifs

Les hypothèses de l'étude sont :

1. Que les comptes de lymphocytes identifiés à l'immunohistochimie seront plus élevés que les comptes de lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran.
2. D'observer une variabilité dans le nombre de lymphocytes et d'éosinophiles dans la lamina propria ainsi que dans la proportion des mucines neutres vs acides en fonction de l'alimentation dans les biopsies duodénales.

Les objectifs de l'étude sont :

1. Comparer le nombre de lymphocytes identifiés à l'immunohistochimie avec celui obtenu avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran dans la lamina propria des biopsies duodénales.
2. Caractériser et quantifier les lymphocytes et les éosinophiles de la lamina propria des biopsies duodénales de chevaux exposés à deux diètes différentes.
3. Évaluer qualitativement le type de mucines des cellules caliciformes des biopsies duodénales de chevaux exposés soumis à deux diètes différentes.

Matériel et méthodes

1. Schéma expérimental de l'alimentation des juments

Les biopsies duodénales ont été prélevées sur sept juments saines de races différentes. Elles avaient un âge moyen de 13 +/- 3 ans et un poids moyen de 463 +/- 44 kg. Les juments ont été soumises pendant un an à la régie de la ferme Frontenac de l'Université de Montréal. Elles étaient donc logées dans des enclos individuels intérieurs et ont reçu 4 traitements antiparasitaires pendant l'année. Aucune des juments n'a reçu de médication pour une période de 14 jours avant la mise en place du protocole de cette étude-ci. Le protocole et les procédures de cette étude ont été approuvés par le Comité d'éthique de l'utilisation des animaux de l'Université de Montréal. Il est à noter qu'au cours de la période de la seconde diète, une jument (#324) a dû être euthanasiée pour problème comportemental (10 ans et 412 kg). C'est la raison pourquoi il y a une biopsie en moins pour la seconde diète.

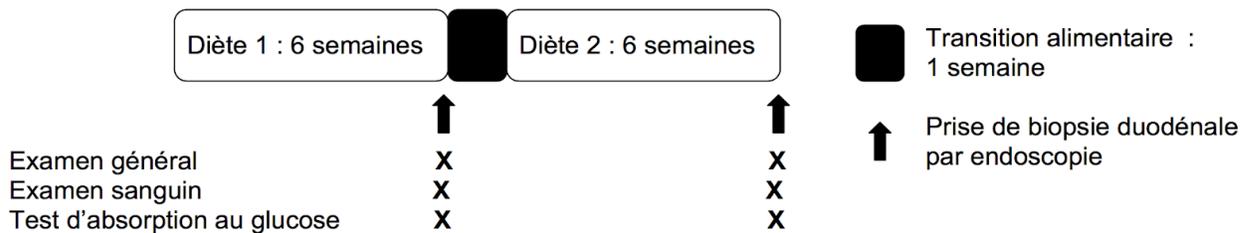


Figure 7. Schéma expérimental de l'alimentation des juments.

La première diète est composée de foin de fléole des prés et de moulée sucrée. La seconde diète est composée de pellets de luzerne et de moulée sucrée.

Les sept juments ont d'abord été nourries avec la première diète pendant six semaines puis avec la seconde pour la même période de temps. Une semaine de transition alimentaire a été accordée entre les deux diètes (Figure 7). La première diète était composée de foin de fléole des prés offert à volonté avec 1 kg de moulée sucrée deux fois par jour. La seconde diète consistait en 4 kg de pellets de luzerne et d'un kg de moulée sucrée deux fois par jour. L'eau était offerte à volonté. La première diète était donc plus riche en fibres tandis que la seconde était plus riche en protéines totales (Tableau I). Un examen physique général, un examen sanguin, un test

d'absorption au glucose ainsi que la prise de biopsie duodénale par endoscopie ont été réalisés avant la mise en place du protocole d'alimentation (jour 0) et à la fin de chaque période de diète.

Tableau I. Analyse des constituants des deux diètes présentées aux juments de l'étude.

Ingrédients	Foin fléole des prés	Pellets de luzerne	Moulée sucrée
Protéines	7-11 %	15 %	14 %
Fibres	48-53 %	29 %	12 %
Gras	-	-	3 %

Pour l'examen sanguin, basé sur un compte cellulaire complet, l'hématocrite, les protéines totales et la concentration de l'albumine étaient regardés pour s'assurer du statut sain des juments.

Pour le test d'absorption au glucose, les juments ont jeûné au cours de la nuit pour une période de 14-16 h avant de recevoir 1g de glucose par kg de poids corporel (glucose anhydre dilué à 20%) par un tube naso-gastrique. Les prises de sang ont été effectuées par ponction veineuse et récoltées dans des tubes héparinés. La glycémie a été évaluée (UniCell DxC600 - Beckman coulter - Brea California) aux intervalles de temps 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 et 240 minutes après l'administration du glucose. L'absorption est considérée normale lorsqu'il y a une augmentation de plus de 85% de la glycémie de départ 90-120 minutes suivant l'administration au glucose. Lorsque l'augmentation est moins de 15% à cet intervalle de temps, il y a présence de malabsorption dite totale. Entre 15% et 85%, il y a suspicion de malabsorption partielle. Seulement la moyenne des données individuelles pour chaque diète est accessible.

2. Biopsies duodénales endoscopiques

À la suite du test de glucose, les juments étaient restreintes et sédâtées avec 0,4 mg/kg de xylazine intraveineux et 0,02 mg/kg de butorphanol intraveineux. Un endoscope de 3 mètres

(Olympus) a été inséré par le naseau et a été amené jusqu'au duodénum proximal. La muqueuse de l'estomac et du duodénum proximal a été évaluée. Une fois dans le duodénum, la pince à biopsie fenestrée a été insérée dans le canal de l'endoscope jusqu'à ce qu'elle dépasse le bout de l'endoscope. Lorsque la pince était proche de la muqueuse à échantillonner, elle a été ouverte et mise en contact avec la muqueuse. Avec pression adéquate contre le tissu, la pince a été fermée et retirée. Quatre à six biopsies ont ainsi été prises par juments. Les biopsies ont été mises dans une solution de formol tamponnée 10% pendant 24 h avant d'être entreposées en bloc de paraffine. Les blocs ont été coupés au microtome (Microm HM355S, Thermo Scientific™) à une épaisseur de 5 microns et mis sur lame. Toutes les biopsies par jument ont été marquées par le CD3, CD20 et colorées à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran ainsi qu'à l'AB PAS. Pour les comptes cellulaires, une seule biopsie par coloration (parmi les 4 à 6 biopsies par jument) a été analysée. Pour choisir la meilleure biopsie, l'échelle de qualité démontrée à la figure 12 a été utilisée. Il y a donc 39 biopsies qui ont été analysées en tout pour les deux immunohistochimies et pour la coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

3. Immunohistochimie

Les biopsies duodénales ont été colorées à l'immunohistochimie pour identifier les lymphocytes T et B de la lamina propria. Pour identifier les lymphocytes T, un anticorps primaire monoclonal murin anti-CD3 humain (Dako, M7254, Mississauga, ON, USA) et un anticorps secondaire biotinylé de cheval anti-souris/lapin (BA-1400, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ont été utilisés à une concentration de 1:200 pour les deux anticorps. Pour identifier les lymphocytes B (Fisher, PA5-16701, Rockford, IL, USA), un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-CD20 félin, canin, humain ainsi que murin et un anticorps secondaire biotinylé de cheval anti-souris/lapin (BA-1400, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ont été utilisés à une concentration de 1:400 pour les deux anticorps.

Pour le contrôle négatif, du sérum de chèvre (#053110, Multicell Wisent, St-Bruno, QC, CAN) avec les mêmes concentrations que les anticorps primaires (1:200 et 1:400) ont été utilisés.

La révélation de l'anticorps secondaire biotinylé s'est fait avec la trousse AEC Peroxidase Substrate (SK-4200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). L'hématoxyline de Mayer's (MHS16, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) a servi de contre-coloration.

Pour le protocole en détail voir Annexe I.

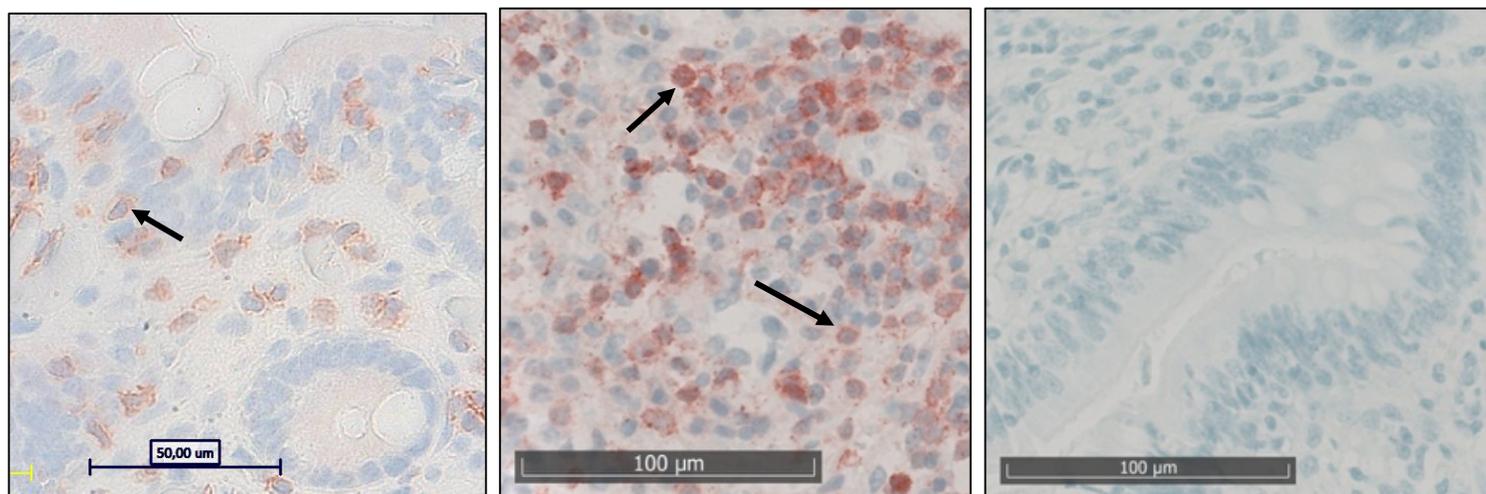


Figure 8. Lymphocytes T identifiés par immunohistochimie

À gauche : Lymphocytes T identifiés par le CD3 sur une biopsie endoscopique du duodénum équin. La flèche pointe un lymphocyte T. Au milieu : Nœud lymphatique mésentérique équin utilisé comme contrôle positif pour les lymphocytes T identifiés avec le CD3. Les flèches pointent des lymphocytes T. À droite : Biopsie pleine épaisseur du duodénum équin utilisé comme contrôle négatif pour le CD3.

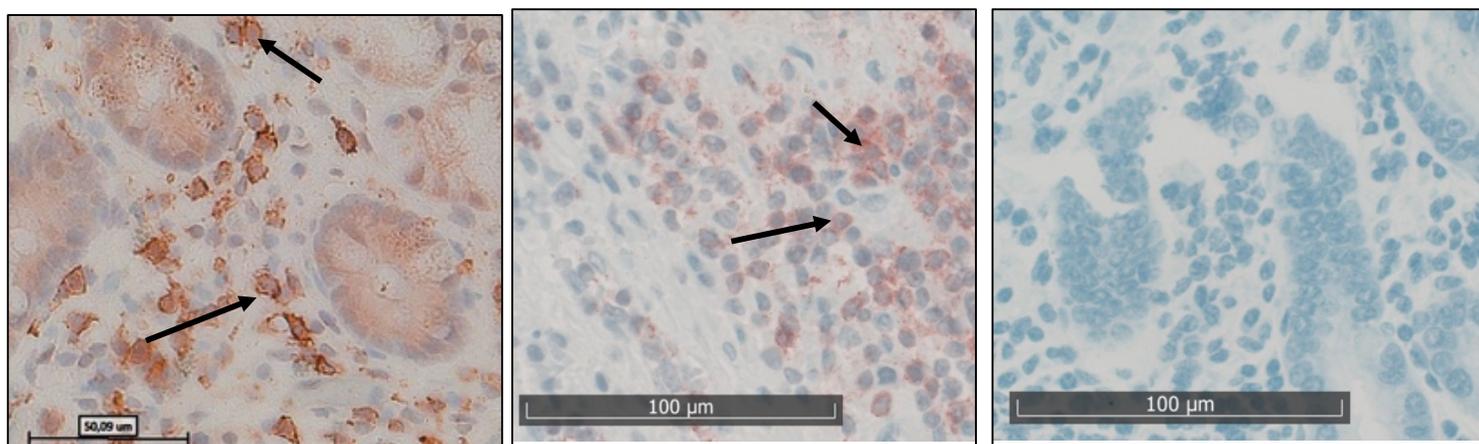


Figure 9. Lymphocytes B identifiés par immunohistochimie

À gauche : Lymphocytes B identifiés par le CD20 sur une biopsie endoscopique du duodénum équin. Les flèches pointent des lymphocytes B. Au milieu : Nœud lymphatique mésentérique équin utilisé comme contrôle positif pour les lymphocytes B identifiés avec le CD20. Les flèches pointent des lymphocytes B. À droite : Biopsie pleine épaisseur du duodénum équin utilisé comme contrôle négatif pour le CD20.

4. Colorations histologiques

4.1. Hématoxyline-éosine-phloxine-safran

Les biopsies duodénales ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran lors du projet initial. Les lames ont d'abord été mises dans une solution d'hématoxyline de Harris pour colorer les noyaux en bleu. Par la suite, elles sont mises dans une solution d'éosine-phloxine pour colorer les cytoplasmes et la matrice extracellulaire. La phloxine est ajoutée à l'éosine pour intensifier la coloration (48). Lors de la déshydratation, les lames ont été plongées dans une solution de safran pour faire ressortir les fibres de collagène en les colorant en jaune orangé (48). Pour ce projet, les lymphocytes ainsi que les éosinophiles sont évalués avec cette coloration (Figure 10). Pour le protocole en détail voir Annexe II.

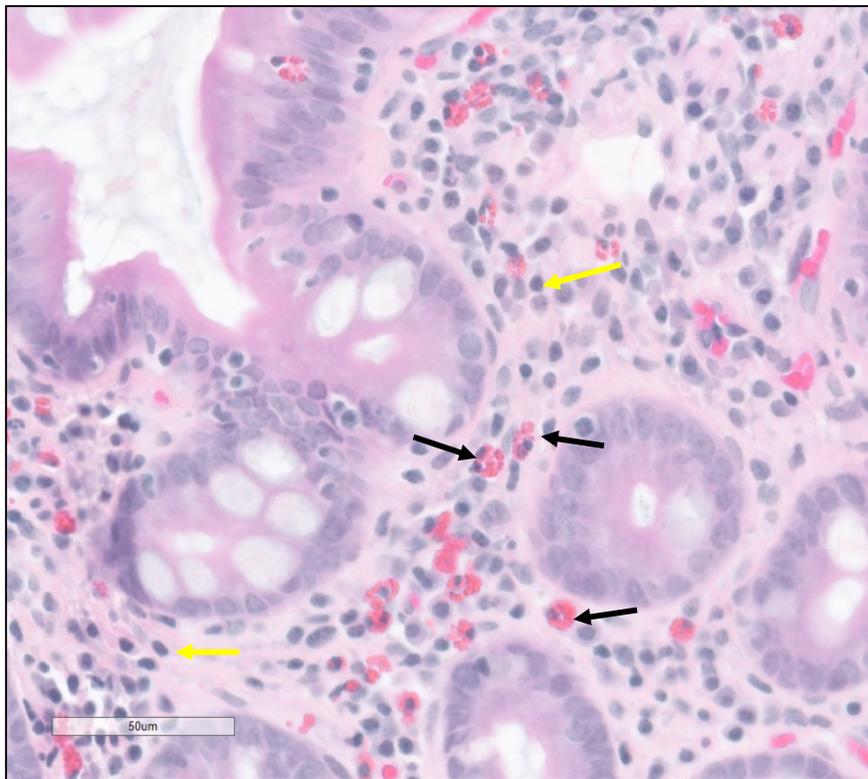


Figure 10. Identification d'un lymphocyte et d'un éosinophile à l'HEPS.

Une photo de biopsies endoscopiques de l'intestin grêle équin colorées à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran. Les flèches jaunes pointent des lymphocytes et les flèches noires pointent des éosinophiles. 40X.

HEPS : Hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

4.2. Alcian Bleu *Periodic Acid Schiff*

Les biopsies duodénales ont été colorées à la coloration AB PAS pour identifier les mucines des cellules caliciformes. Les lames ont été mises dans une solution acide d'alcian bleu pour colorer les mucines acides en bleu. Ensuite, elles ont été recouvertes du réactif de Schiff (Sigma, 3952016) pour colorer les mucines neutres en magenta. Lorsqu'une cellule est de couleur pourpre, c'est qu'elle contient un mélange de mucines acide et neutre. Pour le protocole en détail voir Annexe III.



Figure 11. Biopsies de l'intestin grêle équin colorées à l'AB PAS

Trois photos de biopsies endoscopiques de l'intestin grêle équin colorées à l'AB PAS. À gauche : la flèche pointe une cellule caliciforme dont les mucines sont mixtes. Au milieu : la flèche pointe une cellule caliciforme dont les mucines sont plutôt neutres. À droite : la flèche pointe une cellule caliciforme dont les mucines sont plutôt acides.

ABPAS : Alcian bleu *Periodic Acid Schiff*

5. Technique de dénombrement cellulaire

5.1. Calcul de l'aire

Les captures d'image des IHC ont été prises à l'aide d'un microscope Leica DM4000B (Leica Microsystems Digital Imaging, U.K.) relié à une caméra Prosilica GT (modèle GT1920C). Les images ont été obtenues à 400x avec le système de capture en continu Panoptiq (Panoptiq™ v.1.4.3, ViewsIQ, Richmond, CAN). L'aire de la lamina propria des biopsies a été mesuré à l'aide du programme Aperio ImageScope (Leica Microsystems, v12.3.2.8013) avec de l'outil Stylo et Stylo Négatif. Toute la lamina propria de la biopsie a été mesurée, mais les aires des vaisseaux, des glandes ainsi que les plaques de Peyer ont été soustraites par la suite.

5.2. Comptage des cellules

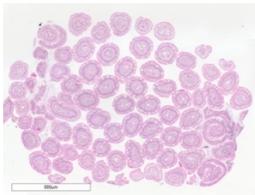
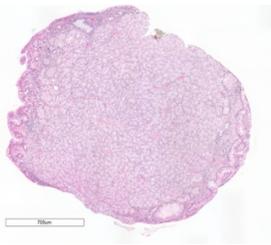
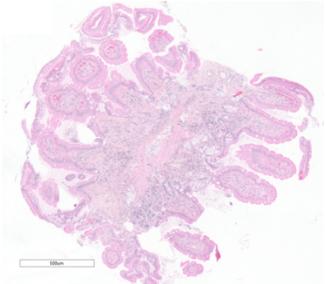
Le comptage des cellules marquées à l'immunohistochimie ou colorées à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran s'est effectué avec le programme Aperio ImageScope (Leica Microsystems, v12.3.2.8013) à l'aide de l'outil Compteur. Seules les cellules marquées se trouvant dans les aires de lamina propria délimitées sur les images de biopsie étaient comptées. Le comptage a été effectué à l'aveugle et par une seule personne.

6. Classement des mucines

Toutes les lames de toutes les juments confondues ont d'abord été regardées pour établir un classement basé sur les critères de couleur et d'intensité de couleur. Pour les couleurs, les mucines étaient classées soient en rose, bleu ou pourpre. Pour l'intensité, il y avait trois choix soient faible, modérée ou forte. Les mucines ne variaient pas d'une biopsie à l'autre pour un seul individu, il était donc plus facile de donner un classement d'intensité et de couleur par jument. Donc, les 4 à 6 biopsies par jument ont été analysées pour déterminer dans quelle catégorie de couleur et d'intensité la jument faisait partie.

7. Qualité des biopsies endoscopiques duodénales

Les critères de qualité décrits chez les chats et chiens ont été utilisés pour faire l'échelle suivante. Celle-ci nous a orienté sur l'impact que la qualité des biopsies endoscopiques pouvait avoir sur les résultats de l'étude (47) (Figure 12). Cependant, cette échelle n'a pas été testée ni approuvée pour l'espèce équine.

Description		Cote	Exemples
<ul style="list-style-type: none"> • Orientation du tissu inadéquate/marginale ou structure cellulaire non préservée. • Absence de la lamina propria des villosités ou cryptes. • L'épithélium des villosités n'est pas en continuité avec l'épithélium des cryptes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Majorité de villosité en coupe transversale 	1.a	
	<ul style="list-style-type: none"> • Majorité de lamina propria des cryptes avec peu de villosités en coupe transversale 	1.b	
<ul style="list-style-type: none"> • Orientation du tissu acceptable avec une structure cellulaire préservée. • Présence d'au moins une villosité complète dont l'épithélium est en continu avec l'épithélium des cryptes. • Les autres villosités sont plus ou moins en continu. 	<ul style="list-style-type: none"> • Orientation axée sur les villosités. • Plus de lamina propria des villosités que celle des cryptes. 	2.a	
	<ul style="list-style-type: none"> • Orientation axée sur les cryptes. • Plus de lamina propria des cryptes que celle des villosités. • Présence ou absence de <i>muscularis mucosae</i>. 	2.b	

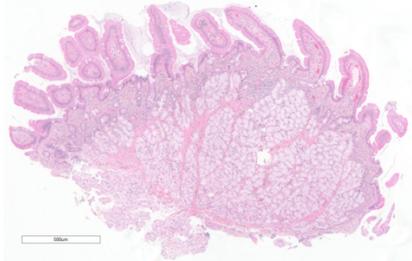
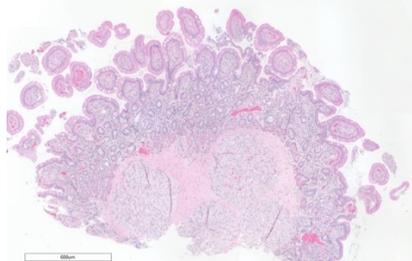
			
	<ul style="list-style-type: none"> • Autant de lamina propria de villosité que des cryptes. • Présence ou non de <i>muscularis mucosae</i> 	2.c	
<ul style="list-style-type: none"> • Orientation adéquate de la pointe des villosités jusqu'à la base des cryptes. • La <i>muscularis mucosae</i> peut être présente ou non. • Structure cellulaire préservée. • Présence d'au moins 3 villosités ou plus. 		3	

Figure 12. Échelle de gradation de la qualité des biopsies duodénales endoscopiques équine.

L'échelle de qualité des biopsies duodénales endoscopiques est basée sur les critères de qualité décrits par le World Small Animal Veterinary Association chez les chats et les chiens.

8. Statistiques

Pour comparer le nombre de lymphocytes identifiés à l'immunohistochimie avec le nombre de lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran ainsi que pour comparer l'effet des diètes sur les nombres de lymphocytes et d'éosinophiles pour le groupe de jument, un modèle linéaire à effet mixte a été utilisé. L'individu a été désigné comme l'effet aléatoire (deux mesures non indépendantes par sujet) et la diète comme l'effet fixe. Ce modèle a été utilisé pour éviter de perdre une donnée (la jument euthanasiée entre les deux diètes) vu que l'échantillon de départ était déjà très petit.

Pour la composition des cellules caliciformes, une évaluation qualitative sans analyses statistiques plus poussées a été utilisée pour classer les résultats en trois catégories soit acide (bleu), neutre (rose) ou un mélange des deux types de mucine (pourpre).

Pour l'analyse de l'impact de la qualité des biopsies sur le compte de cellule, une corrélation non paramétrique de Spearman a été utilisée puisque le score a été donné de façon ordinale. Les analyses ont été faites sur les deux diètes séparément pour avoir des échantillons indépendants.

Résultats

1. Tests cliniques

L'hématocrite, les protéines totales et la concentration de l'albumine étaient dans les références normales pour toutes les juments.

Le test d'absorption au glucose indiquait une absorption normale pour toutes les juments. Après la première diète, la plus haute valeur de glycémie moyenne était à 120 minutes post-glucose, ce qui donne une augmentation de 112% de la glycémie moyenne de départ. Suite à la seconde diète, la plus haute valeur de glycémie moyenne était à 90 minutes post-glucose, ce qui donne une augmentation de 87% de la glycémie moyenne de départ. La différence entre les deux moyennes n'est pas due à un effet de la diète.

2. Qualité des biopsies endoscopiques duodénales

Le score de qualité donné à chaque biopsie se trouve dans le tableau 5 en annexe VI. Le tableau II regroupe les biopsies selon leur qualité et selon les colorations. Pour l'immunomarquage des lymphocytes T avec le CD3, 3/13 biopsies sont de qualité adéquate. Pour l'immunomarquage des lymphocytes B avec le CD20, 1/13 biopsies est de qualité adéquate. Pour les biopsies colorées à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, 1/13 biopsies est de qualité adéquate. Pour la première diète, toutes colorations confondues, 5/21 biopsies sont de qualité adéquate et pour la seconde diète, il y a également 5/18 biopsies qui sont de qualité adéquate.

Tableau II. Nombre de biopsies pour chaque catégorie de qualité selon les colorations et les deux diètes.

Qualité	Diète	Biopsies identifiées avec le CD3	Biopsies identifiées avec le CD20	Biopsies colorées au HEPS
Adéquate	1	3	1	1
	2	0	2	3
	Total	3	3	4
Acceptable	1	2	5	4
	2	5	1	3
	Total	7*	6*	7
Inadéquate	1	2	1	2
	2	1	3	0
	Total	3	4	2

* Les biopsies sont toutes orientées sur les villosités. HEPS = hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

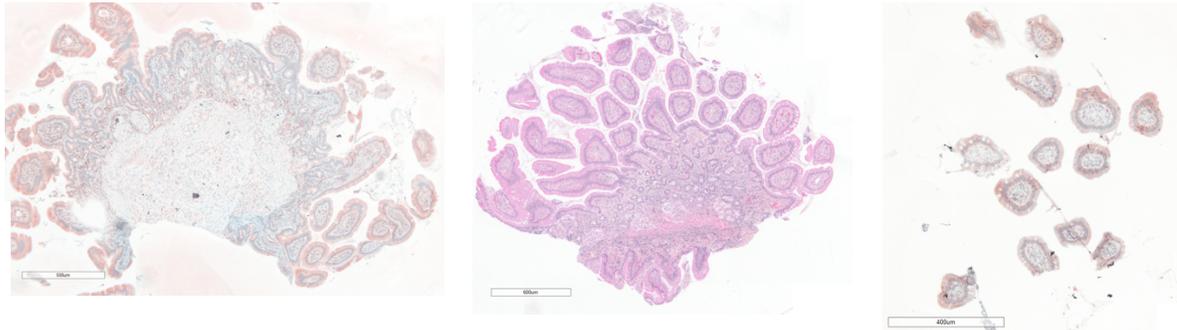


Figure 13. Qualité des biopsies endoscopiques duodénales de l'étude.

20X. À gauche : Biopsie de qualité adéquate appartenant à la jument 328. Immunomarquage avec le CD20. Au milieu : Biopsie de qualité acceptable appartenant à la jument 324. Coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran. À droite : Biopsie de qualité inadéquate appartenant à la jument 84. Immunomarquage avec le CD3.

Les résultats des analyses statistiques de l'impact de la qualité sur les comptes de cellules varient beaucoup (Tableau III). Nous ne pouvons donc pas conclure si la qualité a ou n'a pas d'influence sur les comptes de lymphocytes et d'éosinophiles.

Tableau III. Résultats de l'analyse statistique de l'impact de la qualité de la biopsie sur les comptes de cellules.

Variable	r	n	p
Diète 1			
CD3	0,15	7	>0,5
CD20	-0,13	7	>0,5
HEPS	-0,11	7	>0,5
Éosinophiles	0,40	7	0,2<p<0,5
Diète 2			
CD3	-0,89	6	0,2<p<0,5
CD20	0,74	6	0,1<p<0,2
HEPS	-0,28	6	>0,5
Éosinophiles	-0,93	6	0,01

r = Valeur de coefficient de corrélation qui varie entre -1 et 1, 0 = absence de corrélation et le signe donne la direction de l'association. n = taille de l'échantillon.

CD3 = Nombre de lymphocytes T identifiés avec le marqueur CD3

CD20 = Nombre de lymphocytes B identifiés avec le marqueur CD20

HEPS = Nombre de lymphocytes identifiés avec la coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

3. Lymphocytes identifiés par immunohistochimie vs par hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

Pour évaluer les lymphocytes totaux à l'immunohistochimie, les comptes de lymphocytes T marqués au CD3 ont été additionnés aux comptes de lymphocytes B marqués au CD20. Pour 11 des 13 biopsies, le compte de lymphocytes totaux était plus élevé lorsqu'ils étaient identifiés avec l'immunohistochimie que lorsqu'ils étaient identifiés avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran ($p = 0,057$) (Figure 14).

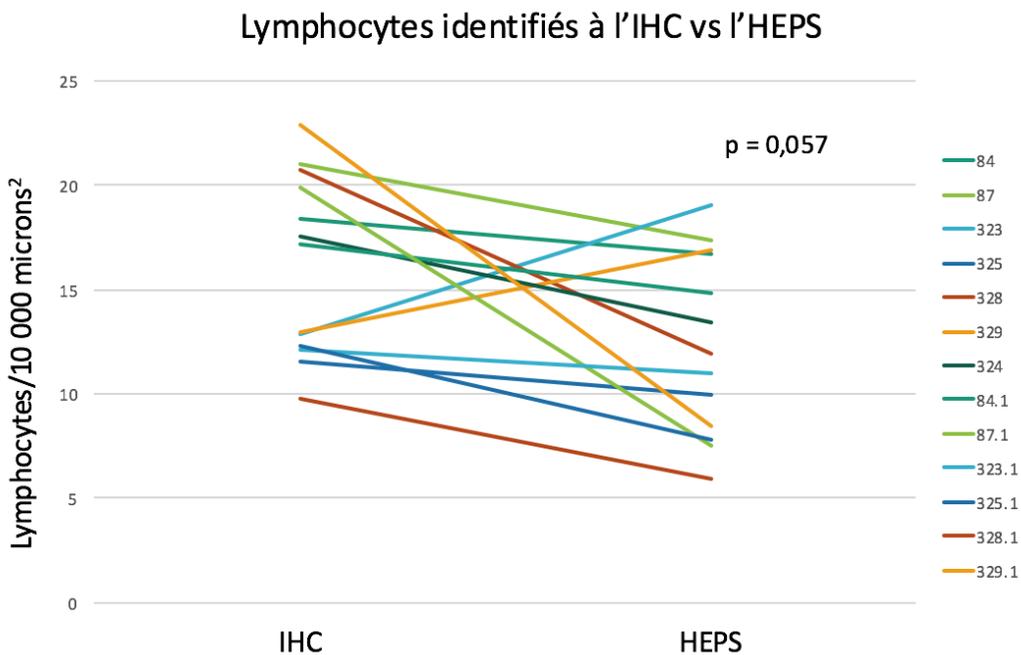


Figure 14. Lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran et à l'immunohistochimie.

Les comptes de lymphocyte exprimés en nombre de lymphocytes par 10 000 μm^2 de lamina propria. Les lymphocytes ont d'abord été identifiés à l'immunohistochimie et ensuite à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran pour chaque des biopsies duodénales ($n = 13$).

IHC = immunohistochimie. HEPS = hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

Si nous séparons les résultats des biopsies en fonction des diètes, nous obtenons un résultat significatif pour la seconde diète seulement ($p = 0,036$) (Figure 15).

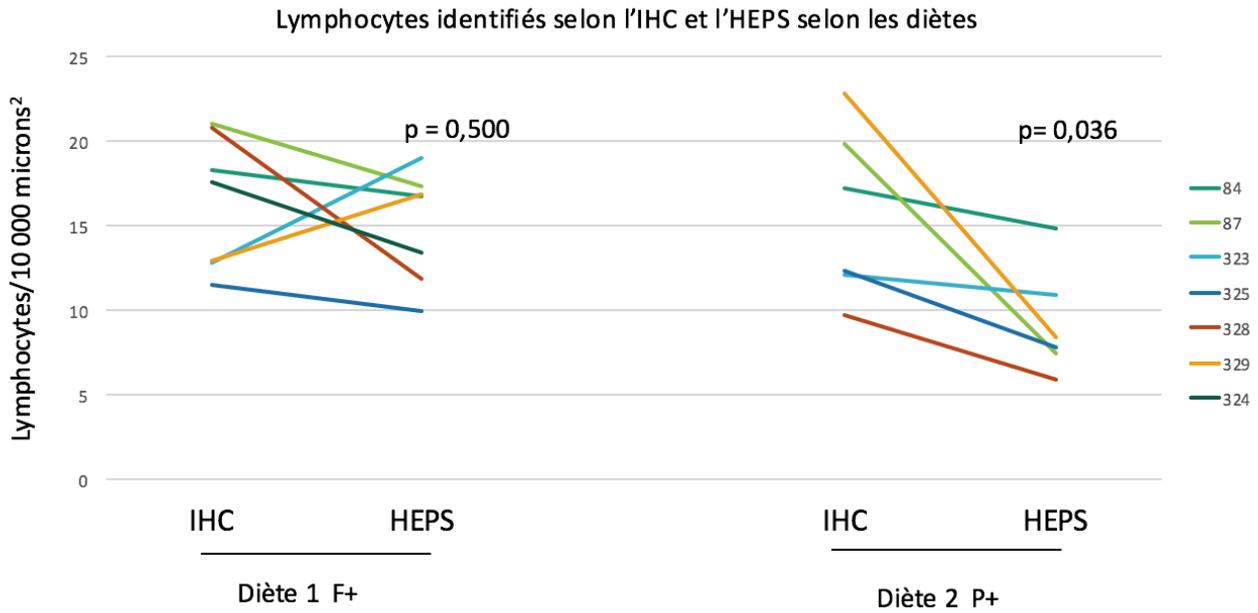


Figure 15. Lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran et à l'immunohistochimie.

Les comptes de lymphocyte exprimés en nombre de lymphocytes par 10 000 μm^2 de lamina propria. Les lymphocytes ont d'abord été identifiés à l'immunohistochimie et ensuite à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran pour chaque des biopsies duodénales. Les résultats ont été séparés pour les deux différentes diètes ($n = 7$ et $n = 6$).

IHC = immunohistochimie. HEPS = hématoxyline-éosine-phloxine-safran. F + = plus riche en fibres, P+ = plus riche en protéines.

4. Le nombre de lymphocytes identifiés à l'immunohistochimie selon les diètes

4.1.Lymphocytes totaux (lymphocytes T + B)

Les lymphocytes ont été évalués avec l'immunohistochimie puisque lorsqu'ils étaient identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, l'étude préliminaire à celle-ci ne rapportait pas de variation de ces cellules en fonction des diètes. Tout comme les résultats préliminaires, aucune variation dans les comptes de lymphocytes totaux (lymphocytes T marqués au CD3 + lymphocytes B marqués au CD20) n'a été observée en fonction des deux diètes (Figure 16).

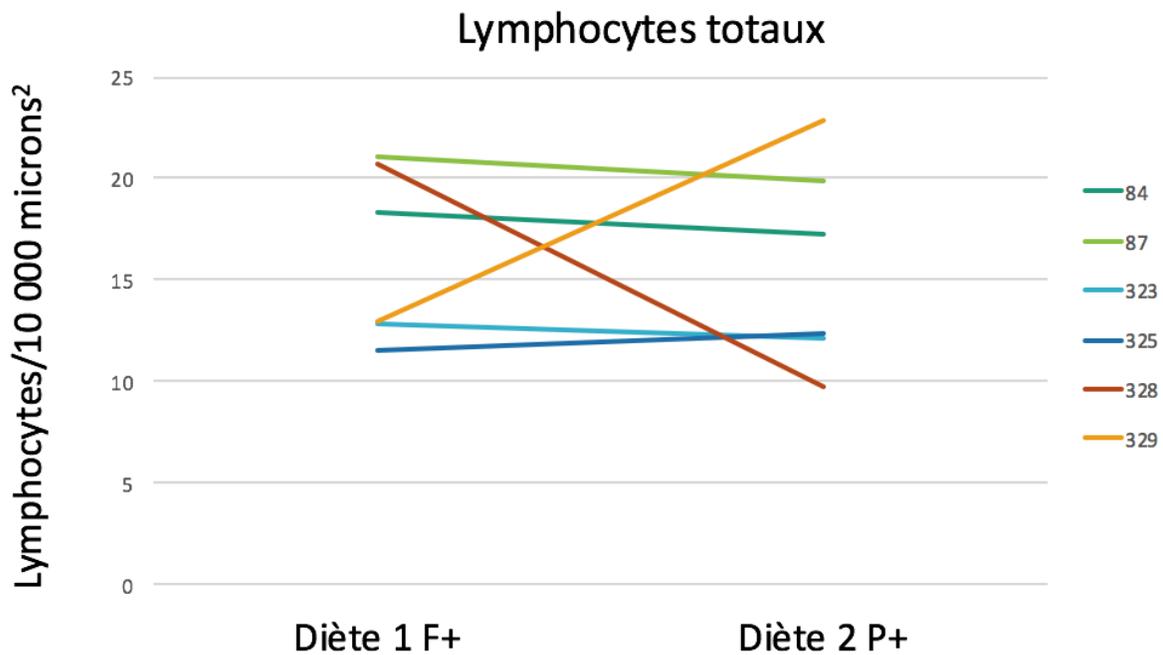


Figure 16. Nombres de lymphocytes totaux identifiés à l'immunohistochimie.

Les résultats du nombre de lymphocytes totaux (lymphocytes identifiés par le marqueur CD3 + CD20 à l'immunohistochimie) de la lamina propria des biopsies duodénales selon les deux diètes. Les comptes sont exprimés en nombre de lymphocytes /10 000 μm^2 de lamina propria. F + = plus riche en fibres, P+ = plus riche en protéines.

4.2.Lymphocytes T

Il n'y a pas de variation significative ($p = 0,316$) dans le nombre de lymphocytes T identifiés à l'immunohistochimie par le CD3 dans la lamina propria de biopsies duodénales équinés en fonction de l'alimentation (Figure 17). Le compte exact de lymphocytes pour chaque biopsie est détaillé dans le tableau 6 en annexe V.

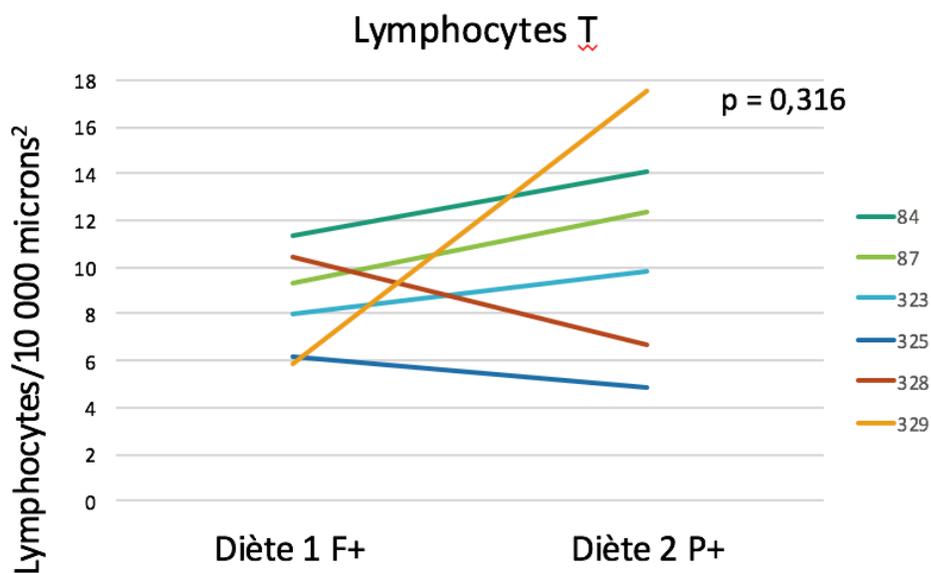


Figure 17. Évaluations quantitatives des lymphocytes T selon les deux diètes.

Les résultats du nombre de lymphocytes T identifiés à l'immunohistochimie par le marqueur CD3 de la lamina propria des biopsies duodénales selon les deux diètes. Les comptes sont exprimés en nombre de lymphocytes T /10 000 μm^2 de lamina propria.

: plus riche en fibres, P+ = plus riche en protéines.

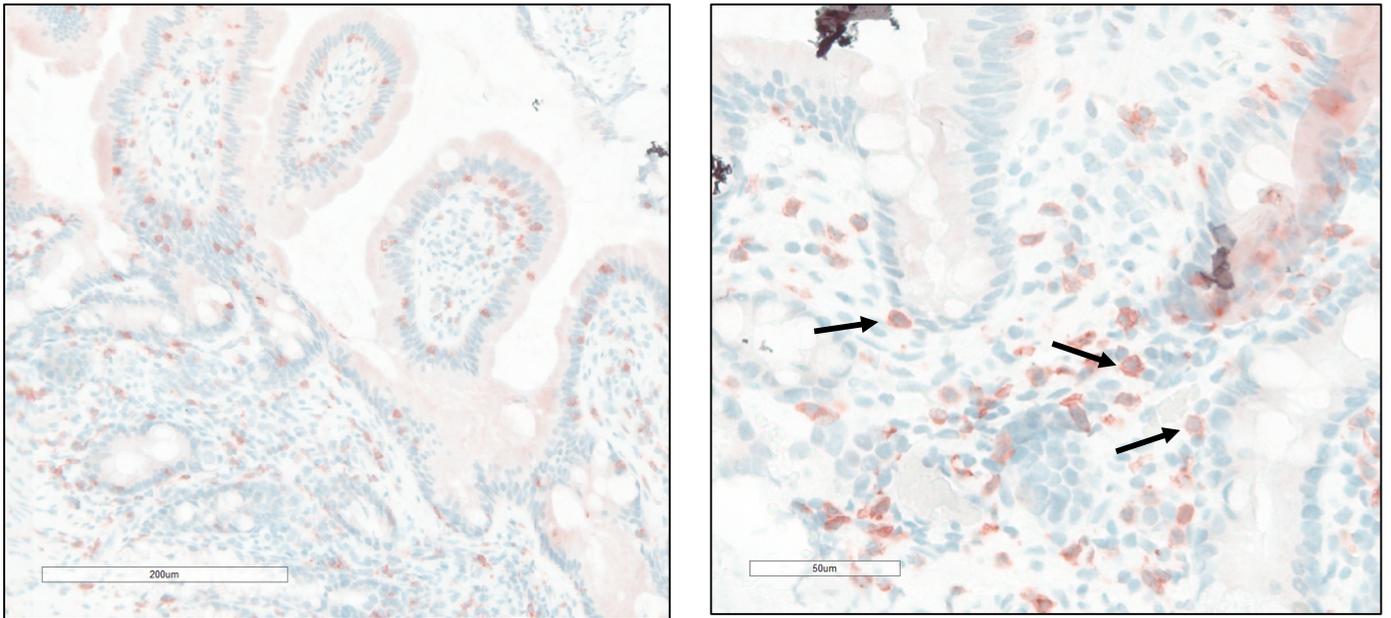


Figure 18. Lymphocytes T identifiés par le CD3.

Biopsie duodénale endoscopique de cheval où les lymphocytes T sont marqués par le CD3. À gauche : Une vue de la biopsie à 20X. À droite : une vue de la biopsie à 40X, les flèches pointent des lymphocytes T.

4.3 Lymphocytes B

Pour 5 des 6 juments, le compte de lymphocytes B était plus élevé dans la lamina propria des biopsies duodénales lorsqu'elles étaient nourries avec une diète plus riche en fibres que lorsqu'elles étaient nourries avec une diète plus riche en protéines ($p = 0,055$) (Figure 19). Le compte exact de lymphocytes pour chaque biopsie est détaillé dans le tableau 7 en annexe V.

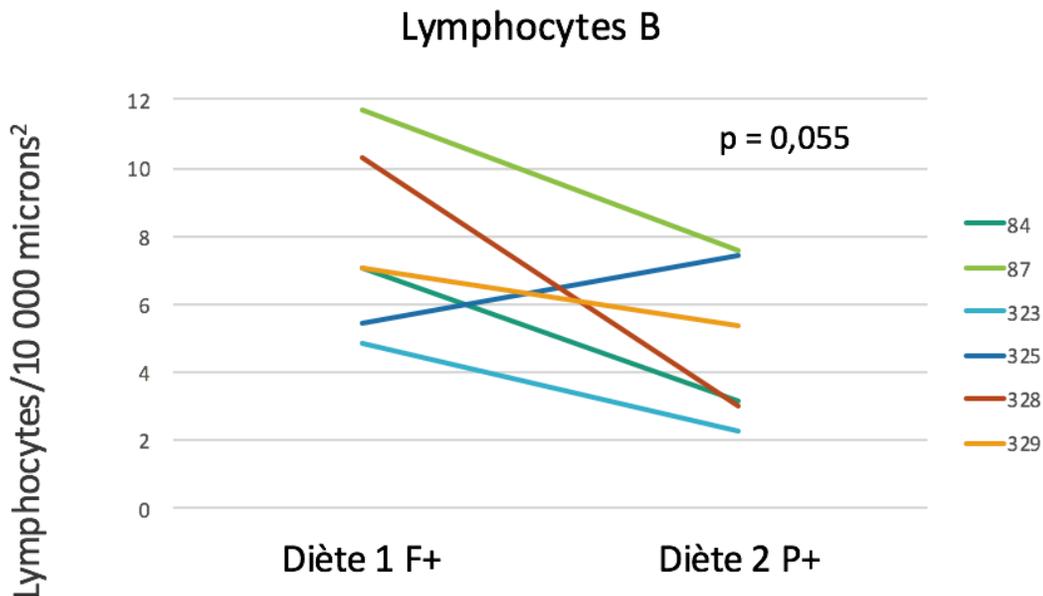


Figure 19. Évaluations quantitatives des lymphocytes B selon les deux diètes.

Les résultats du nombre de lymphocytes B identifiés à l'immunohistochimie par le marqueur CD20 de la lamina propria des biopsies duodénales selon les deux diètes. Les comptes sont exprimés en nombre de lymphocytes B /10 000 μm^2 de lamina propria. F + = plus riche en fibres, P+ = plus riche en protéines.

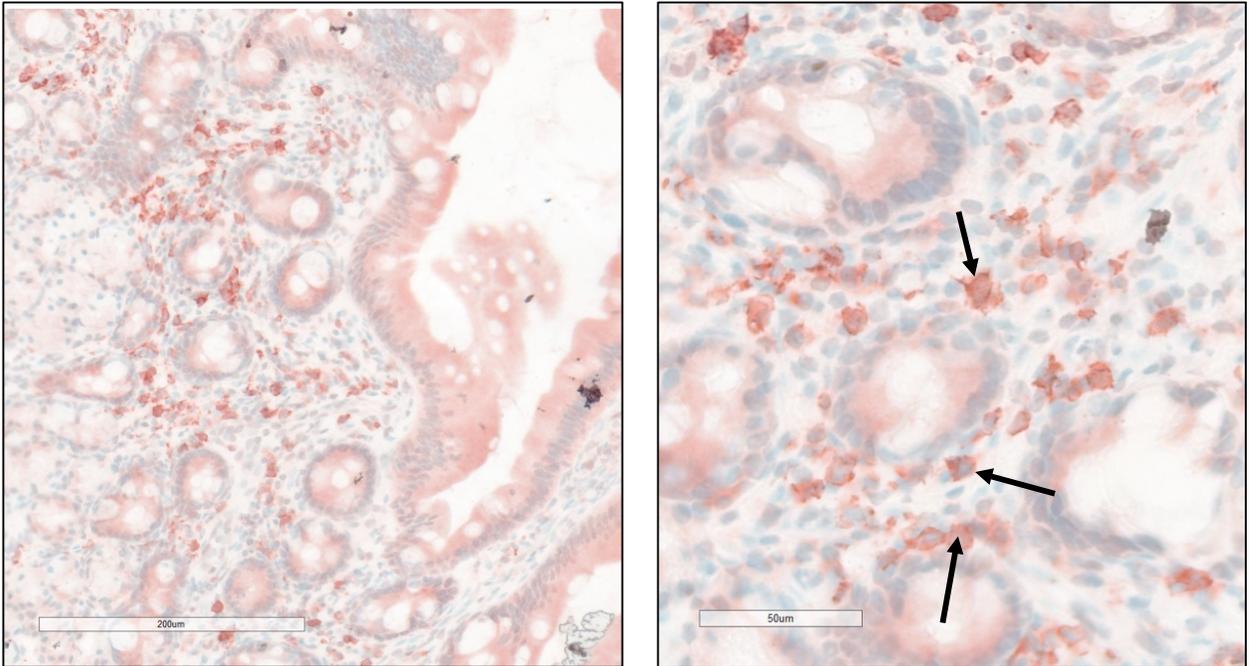


Figure 20. Lymphocytes B identifiés par le CD20.

Biopsie duodénale endoscopique de cheval où les lymphocytes B sont marqués par le CD20. La flèche pointe un lymphocyte B. À gauche : Une vue de la biopsie à 20X. À droite : une vue de la biopsie à 40X, les flèches pointent des lymphocytes B.

4.4 Ratio de lymphocytes

Le ratio lymphocytes T/lymphocytes B est significativement plus élevé ($p = 0,026$) lorsque les juments sont nourries avec une diète plus riche en protéines que lorsqu'elles sont nourries avec une diète plus riche en fibres (Figure 21).

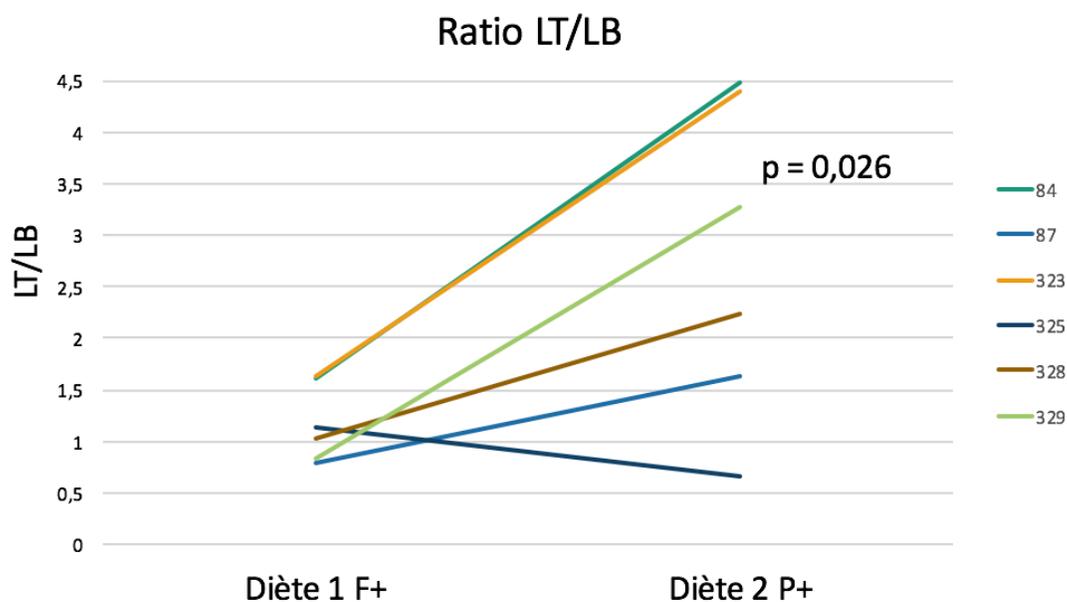


Figure 21. Ratio LT/LB

Les résultats du ratio lymphocytes T sur lymphocytes B de la lamina propria de biopsies duodénales pour les deux diètes.

F + = plus riche en fibres, P+ = plus riche en protéines.

5. Les éosinophiles selon les diètes

Les éosinophiles sont des cellules faciles à identifier dans les biopsies duodénales colorées à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran. Les résultats démontrent que les comptes des éosinophiles de la lamina propria de biopsies duodénales ne varie pas en fonction des deux diètes (Figure 22). À noter que la jument 84 a un nombre d'éosinophiles beaucoup plus élevé que les autres juments autant pour la première que la seconde diète. Cette jument a aussi beaucoup plus de plasmocytes que les autres individus lorsqu'on regarde les biopsies de manière semi-quantitative. Le compte exact d'éosinophiles pour chaque biopsie est détaillé dans le tableau 8 en annexe V.

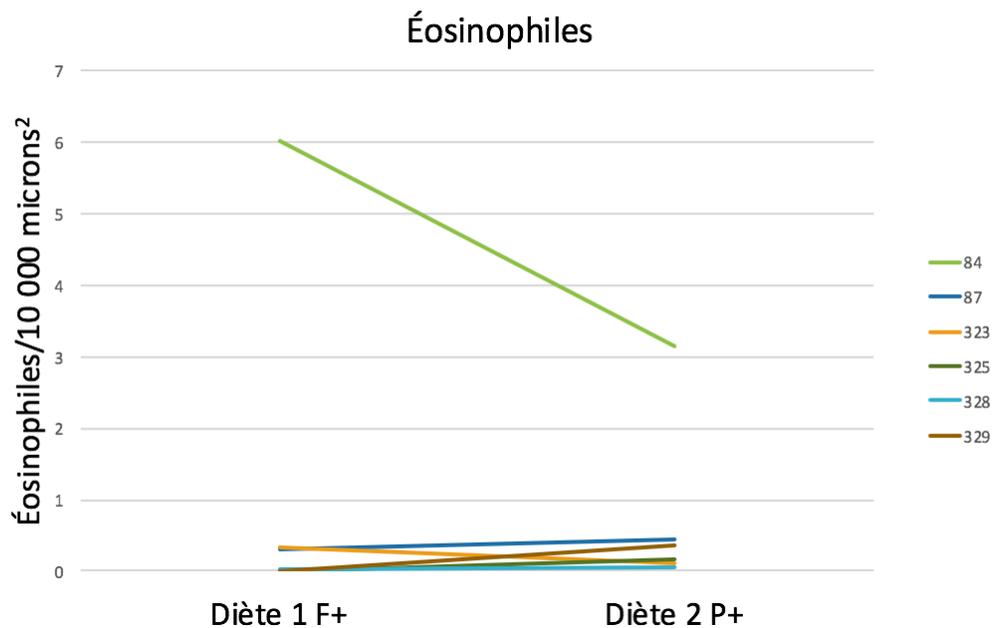


Figure 22. Évaluations quantitatives des éosinophiles selon les deux diètes.

Les comptes d'éosinophiles sont exprimés en nombre d'éosinophiles /10 000 μm^2 de lamina propria.

F + = plus riche en fibres, P+ = plus riche en protéines.

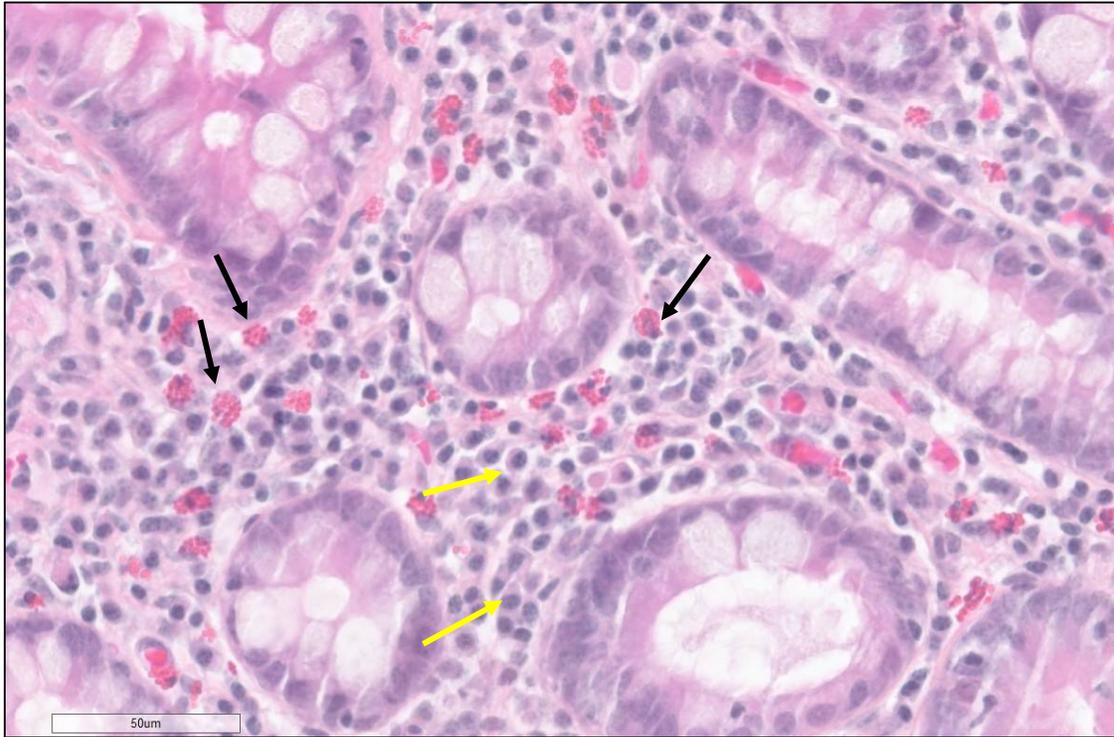


Figure 23. Éosinophiles colorés avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

Biopsie duodénale de la jument #84 qui avait beaucoup d'éosinophiles et de plasmocytes vs les autres juments. Les flèches noires pointent des éosinophiles. Les flèches jaunes pointent des plasmocytes.

6. La composition des mucines selon les diètes

Les biopsies duodénales des deux diètes comportaient toutes une majorité de cellules caliciformes intensément colorées comprenant un mélange de mucines acides et neutres au sein d'une même cellule. Cinq biopsies comportaient une faible quantité de cellules à mucines neutres tandis que six biopsies comportaient une faible quantité de cellules à mucines acides. Ces faibles variations ne sont pas corrélées avec une des deux diètes. Puisque l'échantillon est très petit et que ces résultats ne démontraient pas de tendance, les analyses statistiques n'ont pas été plus poussées.

Tableau VI. Résultats de l'évaluation qualitative des mucines

Numéro de la jument	Diète	Mucines acides	Mucines mixtes	Mucines neutres
84	1		X	x
	2		X	x
87	1		X	x
	2	x	X	
323	1	x	X	
	2	x	X	
325	1		X	x
	2	x	X	
328	1	x	X	
	2	x	X	
329	1	x	X	
	2	x	X	
324	1		X	x
	2	-	-	-

X = Majorité des cellules caliciformes. x = Quelques cellules caliciformes.

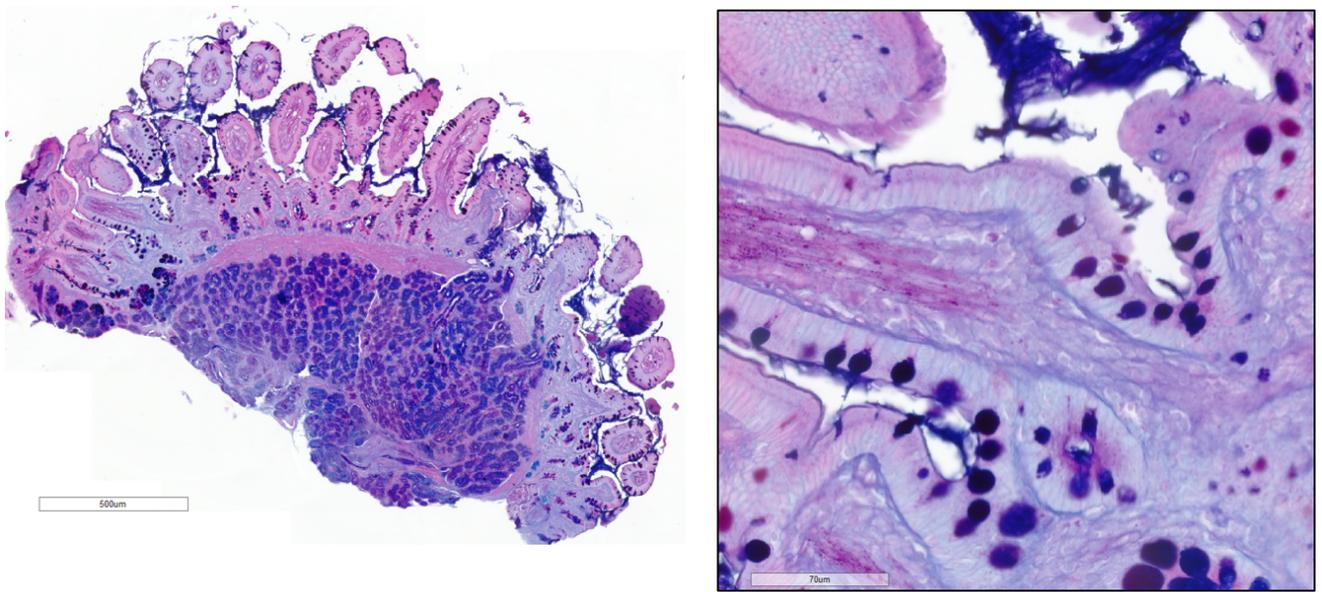


Figure 24. Biopsies duodénales endoscopiques de chevaux colorées à l'ABPAS.

À gauche : Une vue de la biopsie à 20X. À droite : Une vue de la biopsie à 40X, les cellules caliciformes
ABPAS : Alcian Bleu *Periodic Acid Schiff*

Discussion

1. Rappel des résultats

L'augmentation significative ($p = 0,026$) du ratio lymphocyte T/lymphocyte B dans la lamina propria de biopsies duodénales sont observées lorsque les juments sont nourries avec une diète plus riche en protéines. Pour 5 des 6 juments, le compte de lymphocytes B était plus élevé lorsqu'elles étaient nourries avec une diète plus riche en fibres ($p = 0,055$). Les lymphocytes totaux, les lymphocytes T, les éosinophiles et les mucines ne changent pas selon les diètes offertes. Pour 11 des 13 biopsies, le compte de lymphocytes totaux était plus élevé lorsqu'ils étaient identifiés avec l'immunohistochimie que lorsqu'ils étaient identifiés avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran ($p = 0,057$). Lorsque nous séparons les résultats des biopsies en fonction des diètes, pour la seconde diète le compte de lymphocytes totaux était plus élevé lorsqu'ils étaient identifiés avec l'immunohistochimie que lorsqu'ils étaient identifiés avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran ($p = 0,036$).

2. Hématoxyline-éosine-phloxine-safran vs immunohistochimie

L'étude de Moreau et *al.* a conclu que l'évaluation semi-quantitative des leucocytes de la muqueuse intestinale équine ne variait pas en fonction des diètes (4). De nombreuses études démontrent que l'alimentation a des effets directs, en stimulant les différents leucocytes, et/ou indirects, en modifiant le microbiote, sur l'immunité intestinale (2, 5, 71). Nous avons postulé qu'une coloration non spécifique aux différentes cellules immunitaires ainsi qu'une méthode d'évaluation semi-quantitative du nombre de ces cellules n'ont peut-être pas été suffisantes pour déceler des différences significatives entre les diètes. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser l'immunohistochimie pour quantifier les lymphocytes, cellules centrales de l'immunité adaptative. L'objectif était de comparer le compte des lymphocytes identifiés par une coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran avec celui fait avec l'immunohistochimie. Pour 11 des 13 biopsies, le compte de lymphocytes totaux était plus élevé lorsqu'ils étaient identifiés avec l'immunohistochimie que lorsqu'ils étaient identifiés avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran ($p = 0,057$). Comme nous trouvons intuitivement plus facile d'évaluer un lymphocyte ciblé à l'immunohistochimie, en considérant aussi ses paramètres morphologiques, que

d'évaluer un lymphocyte juste par sa morphologie avec l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, nous avons identifié quelques facteurs qui ont pu affecter la différence entre les comptes des deux méthodes d'identification. Premièrement, une faible puissance statistique due au nombre limité de chevaux étudiés a pu influencer la significativité de nos résultats. Pour avoir une puissance de 80% avec un seuil alpha de 5%, nous aurions eu besoin de 10 chevaux soumis à chacune des deux diètes. Deuxièmement, un résultat significatif aurait pu être obtenu si nos biopsies avaient été plus récentes et/ou entreposées de manière adéquate. Suite au projet initial, les blocs de paraffine entamés n'étaient pas entreposés dans les conditions décrites comme optimales dans la littérature. Elles sont restées pendant plus d'une dizaine d'années à la température et à l'humidité de la pièce alors que les antigènes sont mieux préservés à une basse température exempte d'humidité. Ceci a pu modifier les antigènes ciblés, occasionner une perte de leur antigénicité et aboutir à un marquage plus faible des lymphocytes (53). En plus de nécessiter la bonne morphologie (cellule ronde avec un noyau rond et un ratio noyau/cytoplasme élevé), les lymphocytes devaient être bien délimités avec une forte coloration pour être comptabilisés. Un marquage partiel a pu sous-estimer le compte des lymphocytes identifiés à l'immunohistochimie et ainsi diminuer la différence entre les deux colorations. Troisièmement, des biopsies de meilleure qualité pourraient accentuer la différence entre les deux méthodes de coloration des lymphocytes. Il est démontré chez les chiens et les chats que l'orientation de coupe des biopsies a une influence sur leur interprétation (47). Chez les chevaux, les lymphocytes B résident en grande majorité dans la lamina propria se situant à la base des cryptes (13, 81). Une orientation favorisant la lamina propria des villosités de la biopsie pourrait diminuer le compte de ces cellules. Comme près de la moitié des biopsies colorées à l'immunohistochimie (6/13) étaient toutes orientées vers les villosités, la quantité totale de lymphocytes a pu être sous-estimée dû au fait que les lymphocytes B n'étaient pas présents dans cette portion de lamina propria. Ceci a pu réduire la différence entre les deux méthodes d'identification de lymphocyte. De plus, une seule biopsie par cheval a été évaluée. Outre la faible puissance que cela donne à nos statistiques, la qualité de la biopsie a pu avoir plus d'importance sur leur interprétation. Il est démontré, chez les chats et chiens, que plus les biopsies sont de moindre qualité, plus le nombre observé doit être élevé pour avoir un portrait juste de l'histologie intestinale (47). Quatrièmement, il est intuitif de penser que plus la quantité

d'aire de lamina propria à analyser est grande, plus de cellules seront comptées et que cela influence les comptes de cellule. Il est important de préciser que, dans notre contexte, nous pouvons supposer que la qualité de la biopsie a un impact plus important sur les comptes de cellules que la quantité de lamina propria analysée. En d'autres termes, une biopsie de moindre qualité avec beaucoup de lamina propria disponible aurait plus d'impact négatif sur le compte de cellule qu'une biopsie de petite taille avec peu de lamina propria mais de qualité adéquate. Par exemple, si une grande quantité de lamina propria est disponible, mais que celle-ci est en majorité axée sur les villosités, l'interprétation du nombre de cellules à compter risque d'être faussée si cette cellule se retrouve dans la lamina propria à la base des cryptes. Si une plus petite biopsie avec une quantité moindre de lamina propria est analysée, mais que celle-ci est orientée de façon idéale, l'interprétation du nombre de cellules à compter risque d'être plus juste que l'exemple précédent. Comme la qualité des biopsies pour les lames à l'immunohistochimie et pour les lames à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran n'est pas similaire, nous ne pouvons pas dire que la quantité de lamina propria a de l'influence sur les évaluations quantitatives des lymphocytes de cette étude. Finalement, nous pouvons aussi ajouter à cette liste l'effet que l'évaluateur a pu avoir sur les résultats de l'étude. Les cellules ont été comptées une seule fois par le même évaluateur, si un biais a été introduit, il a été introduit de la même façon pour toutes les biopsies. L'expérience limitée de l'évaluateur a pu affecter à la baisse les comptes de lymphocytes identifiés à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran puisqu'étant une coloration non spécifique à ces cellules, seulement les lymphocytes qui étaient morphologiquement typiques étaient comptés. Un second compte par un évaluateur compétent aurait pu permettre de contrer ces biais pour obtenir des résultats plus justes.

Lorsqu'on sépare les résultats des biopsies en fonction des deux diètes, les comptes de lymphocytes identifiés à l'immunohistochimie sont significativement plus hauts ($p = 0,036$) que les comptes à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran pour la seconde diète seulement. La technique de prélèvement de biopsie a été effectuée par une seule personne et le processus de fixation a été fait par le département de pathologie de la faculté de médecine vétérinaire qui procède avec une technique standard. Les biopsies des deux périodes de prélèvement devraient être affectées de la même façon par ce processus. De plus, nous supposons que la diète n'a pas

d'impact sur la technique immunohistochimique du tissu ; c'est-à-dire que l'immunohistochimie colore de la même façon les biopsies de la diète 1 et de la diète 2. La différence de significativité observée peut donc être principalement due à la petite taille de l'échantillon ainsi qu'à la qualité des biopsies disponibles. Premièrement, la petite taille d'échantillon baisse notre puissance statistique et affecte ainsi les résultats. Deuxièmement, les biopsies de la seconde diète étaient légèrement de meilleure qualité, elles pourraient donc donner un portrait plus précis de l'évaluation des lymphocytes. Le fait que ces biopsies soient de meilleure qualité peut faire suite au développement d'une meilleure technique par l'étudiante qui a pris les échantillons.

3. Lymphocytes

3.1.Effets de l'alimentation

Étant la cellule immunitaire la plus nombreuse de la lamina propria intestinale équine ainsi que pour son rôle clé au sein de l'immunité adaptative, nous avons décidé d'identifier spécifiquement les lymphocytes par immunohistochimie (13, 60). Pour répondre au second objectif de l'étude, les lymphocytes T et B ont été identifiés séparément pour pouvoir observer si le type d'alimentation affectait non seulement le nombre de cellules, mais aussi le type d'immunité. La significativité du changement du ratio lymphocytes T/lymphocytes B ($p = 0,026$) nous confirme que la caractérisation des lymphocytes est importante pour observer l'influence de la diète sur ces leucocytes puisque leur nombre total ne change pas. Le changement du ratio que nous observons peut être expliqué par le changement observé des lymphocytes B. Effectivement, leur compte était plus bas pour 5 sur 6 juments lorsqu'elles étaient nourries avec une diète plus riche en protéines ($p = 0,055$), ceci fait en sorte que le ratio est augmenté avec la seconde diète. Pour augmenter la significativité de ce résultat, nous aurions eu besoin de 11 individus pour une puissance de 80% et un seuil alpha de 5%. Pour les lymphocytes T, la faible puissance due à notre petit échantillon a pu influencer les comptes de ces cellules, il aurait fallu 44 individus avec une puissance de 80% et un seuil alpha de 5% pour observer des changements significatifs. Ces résultats sont en contradictions avec la littérature. Les études chez les humains et les murins démontrent qu'une diète riche en fibres, par

l'intermédiaire des bactéries synthétisant des acides gras volatils, favorise une augmentation des lymphocytes Treg, des macrophages et des cellules dendritiques de la muqueuse intestinale (5, 71). Nous aurions donc pensé observer une augmentation des lymphocytes T et, par conséquent, un ratio lymphocytes T/lymphocytes B plus haut lorsque les juments sont nourries avec une diète plus fibreuse. Ce qui n'est pas le cas. Une cause de cette différence avec la littérature peut être en lien avec un différent microbiote équin. Effectivement, puisque le microbiote peut influencer le développement de différents types de lymphocytes, par exemple la bactérie *Bacteroides fragilis* pouvant induire une réponse de type Th1 (5), nous pensons que l'alimentation fibreuse favorise des types de bactéries différents chez les chevaux que chez les humains et murins. Une étude des cytokines ainsi qu'une caractérisation du microbiote équin suite aux différentes diètes pourraient nous éclairer sur le type de réponse lymphocytaire qui a lieu.

3.2.Comparaison des évaluations quantitatives

L'interprétation de la présence des leucocytes d'une biopsie intestinale équine est un défi diagnostique puisqu'il existe peu de littérature rapportant le nombre et la proportion normale de chaque cellule immunitaire qui se trouve dans la muqueuse intestinale saine. À notre connaissance, la seule étude publiée rapportant des évaluations quantitatives de lymphocytes a été faite par Packer et *al.* (2005) qui évalue l'histologie normale de biopsie pleine épaisseur de jéjunum équin (13). Nos comptes de lymphocytes T et B sont plus bas que les leurs. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence. Premièrement, le duodénum équin n'est peut-être pas représentatif de tout l'intestin grêle. L'étude de Packer et *al.* (2005) a étudié le jéjunum tandis que nous avons évalué le duodénum proximal (13). Il n'y a pas d'étude équine qui caractérise les lymphocytes selon les segments intestinaux, mais nous savons que pour l'espèce canine, les lymphocytes changent non seulement selon l'axe crypte-villosité, mais aussi selon le segment intestinal (13, 55). Peut-être que l'intestin équin comporte aussi des concentrations de lymphocytes qui varient selon les différents segments. De plus, Boishuizen et *al.* (2018) rapporte récemment des résultats suggérant qu'une biopsie duodénale n'est peut-être pas suffisamment représentative de toute la longueur de l'intestin grêle puisque des chevaux ayant

un test d'absorption au glucose anormal n'avaient pas de lésions histologiques sur les biopsies endoscopiques duodénales (3). Deuxièmement, l'antigène ciblé pour les lymphocytes B n'est pas le même pour les deux études. Effectivement, nous avons choisi de cibler le CD20 tandis que l'étude de Packer et *al.* (2005) cible le CD79 (13). Outre le marquage non spécifique créant un bruit de fond assez intense selon la concentration de l'anticorps primaire et secondaire, le CD79 se retrouve aussi sur les plasmocytes. Il faut donc discriminer visuellement les plasmocytes des lymphocytes B colorés, ce que les auteurs ont fait. Par contre, la position de la cellule ainsi que les variances d'antigénicité peuvent être des facteurs pouvant surestimer leur compte de lymphocytes. Troisièmement, comme il en a été question dans la section sur l'immunohistochimie vs l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran, la perte d'antigénicité peut aboutir en un compte de lymphocytes plus bas puisque les cellules plus faiblement marquées n'étaient pas comptées. Pour terminer, les différents types de biopsies étudiés peuvent avoir influencé les résultats obtenus. Effectivement, cette étude-ci utilise des biopsies endoscopiques tandis que l'autre étude utilise des biopsies de pleine épaisseur. Les biopsies de pleine épaisseur sont souvent de meilleure qualité pour évaluer une muqueuse que les biopsies endoscopiques (45). Comme nos biopsies étaient majoritairement de qualité acceptable ou inadéquate, nos comptes peuvent donc sous-estimer le nombre réel de lymphocytes.

4. Éosinophiles

4.1.Effets de l'alimentation

Cellules inflammatoires de l'immunité innée, les éosinophiles sont en plus grand nombre dans la muqueuse gastro-intestinale normale que dans toute autre muqueuse saine (12). Pour répondre au second objectif, les éosinophiles de la muqueuse duodénale ont été identifiés avec la coloration hématoxyline-éosine-phloxine-safran puisque dans ce tissu, ils sont facilement discernables avec celle-ci (Figure 23). Selon les résultats observés, l'alimentation n'a pas d'impact sur le nombre d'éosinophiles. Comme aucune littérature ne rapporte de changement en fonction de l'alimentation, nous pouvons supposer que les résultats sont en accord avec celle-ci. Par contre, la qualité des biopsies endoscopiques a pu avoir une influence sur les évaluations

quantitatives de cette cellule. Effectivement, les éosinophiles de la muqueuse intestinale sont présents en plus grand nombre dans la lamina propria des cryptes que dans celle des villosités (12, 13). Comme plusieurs biopsies endoscopiques de qualité acceptable sont axées sur les villosités, une variation dans le nombre de cellules comptées aurait pu être manquée.

4.2.Comparaison des évaluations quantitatives

Deux études faites chez l'espèce équine vont servir de comparaison aux évaluations quantitatives de cette recherche-ci. La première est celle de Packer *et al.* (2005) mentionnée plus haut et la seconde est celle de Rötting *et al.* (2008) qui évalue la quantité d'éosinophiles résidants dans la muqueuse de l'estomac jusqu'au rectum sur des biopsies pleine épaisseur (12, 13). D'abord, si nous faisons abstraction de la jument 84 qui a un nombre d'éosinophiles beaucoup plus élevé que ce qui est rapporté dans la littérature pour le duodénum équin normal, la moyenne des éosinophiles par aire de lamina propria est plus basse que ce qui est rapporté par les deux études. Encore une fois, la qualité de la coupe des biopsies endoscopiques peut expliquer cette différence de résultats. Comme la majorité de lamina propria analysée était orientée sur les villosités, nos comptes d'éosinophiles sont probablement plus bas que ce qu'ils devraient être. De plus, neuf biopsies sur treize sont de qualité acceptable ou inadéquate, il aurait probablement fallu plusieurs échantillons par jument pour avoir une meilleure estimation du nombre de ces cellules. Ensuite, la différence de résultats entre notre étude et celle de Packer *et al.* (2005) peut être expliquée par le segment intestinal étudié (13). Effectivement, comme le rapporte l'étude de Rötting *et al.* (2008), les éosinophiles varient selon les segments intestinaux ; ils augmentent en nombre de l'estomac vers le caecum (12). Ceci pourrait aussi expliquer que nos comptes dans les biopsies duodénales soient plus bas que les comptes de biopsies jéjunales. Pour terminer, la coloration a pu avoir un effet sur les évaluations quantitatives. Effectivement, Rötting *et al.* (2008) ont préféré utiliser la coloration de Luna tandis que nous avons utilisé la coloration à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran (12). Nous savons que chez les murins, la coloration identifiant les éosinophiles est importante puisqu'un éosinophile coloré à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran peut avoir l'air d'un neutrophile (87). Or si ce phénomène existait chez le cheval, nos comptes seraient plus élevés que les comptes d'éosinophiles identifiés avec une coloration spécifique, ce qui n'est pas le cas. À notre

connaissance, les éosinophiles sont facilement identifiables à l'hématoxyline-éosine-phloxine (Figure 23) et de plus, à notre laboratoire de pathologie, la coloration de Luna colore aussi les grands lymphocytes granuleux, ce qui pourrait être une source d'erreur lors du comptage d'éosinophile. Par contre, pour démystifier l'impact des colorations sur les éosinophiles équins, une étude comparative des différentes colorations pourrait être utile pour savoir quel type de coloration est mieux pour quantifier les éosinophiles.

Il est intéressant de noter que la jument 84 démontre des biopsies comportant un nombre élevé d'éosinophiles contrairement aux autres chevaux. Un nombre élevé d'éosinophiles dans la lamina propria de l'intestin peut faire suite à une infection parasitaire et/ou une pathologie éosinophilique intestinale (29, 43). Les juments ont eu un traitement contre les parasites, mais une coprologie de contrôle après chaque diète n'a pas été effectuée. Il est donc possible que la jument 84 ait mal reçu l'antiparasitaire ou qu'elle ait été infectée par un parasite résistant à la médication. Les biopsies de cette jument comportaient aussi un nombre élevé de plasmocytes. La maladie éosinophilique multisystémique chez le cheval est histologiquement caractérisée par une infiltration éosinophilique et lymphoplasmocytaire avec des granulomes éosinophiliques retrouvés dans plusieurs organes (43, 91, 92). Dans la littérature, une plasmocytose avec une éosinophilie de l'intestin est rapportée chez l'humain et les rongeurs. Il est démontré que, dans la muqueuse du petit intestin, les éosinophiles sont nécessaires pour supporter la longévité des plasmocytes sécrétant des IgA (85, 86). Une biopsie duodénale avant le début du protocole d'alimentation aurait pu nous permettre de savoir si cette jument avait une éosinophilie et une plasmocytose avant les périodes de changement de diète et dans le cas échéant, l'écarter de l'étude.

5. Mucines

5.1.Effets de l'alimentation

Les mucines, glycoprotéines majeures de la couche de mucus intestinal et sécrétées par les cellules caliciformes, sont susceptibles aux changements alimentaires (23, 93). Pour

répondre au troisième objectif de l'étude, les cellules caliciformes ont été colorées avec la technique de l'AB PAS pour différencier le type acide ou neutre des mucines. Malgré les nombreuses études rapportant des changements de mucines selon l'alimentation, les résultats de cette étude-ci rapportent que le type de mucine acide ou neutre ne change pas selon les diètes présentées aux chevaux de l'étude. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, le type de fibre de chaque diète est peut-être similaire malgré leur différence en pourcentage. Effectivement, ce n'est pas juste la quantité de fibre qui a un impact sur la santé intestinale, mais le type de fibre qui se trouve dans l'alimentation (12, 93). Le type de fibre de chaque diète n'est pas connu, mais si elles sont similaires, elles engendreront les mêmes effets sur la muqueuse intestinale. Deuxièmement, un changement quantitatif des cellules caliciformes n'a pas été effectué. Comme le rapporte Montagne *et al.* (2003) des changements qualitatifs et /ou quantitatifs des cellules caliciformes peuvent être observés selon la diète (23). Or, cette étude-ci démontre seulement une évaluation qualitative des cellules caliciformes, un changement quantitatif dans le nombre de ces cellules a pu avoir lieu sans avoir de variation dans le type de mucine qu'elles sécrètent. Finalement, le type de coloration n'a peut-être pas été assez précis pour indiquer un changement. Effectivement, la coloration AB PAS distingue seulement les mucines acides des mucines neutres, or il existe différents types de mucines acides (sulfatées ou non) et celles-ci peuvent changer selon le type d'alimentation reçue (23, 93). Il aurait été intéressant de faire une coloration d'alcian bleu avec de la diamine enrichie en fer (HID AB) qui permet la séparation visuelle des deux types de mucines acides (63).

6. Limites du protocole de l'alimentation

Le protocole de l'alimentation des juments a été suivi de façon linéaire dans le temps ; c'est-à-dire que les juments ont d'abord reçu une diète pour une période de temps et ensuite, elles ont reçu la seconde diète pour la même période de temps. Un biais d'effet du temps a pu être introduit avec ce type de protocole puisqu'un changement, qui arrive de façon ponctuelle à un moment durant l'année, a pu affecter les résultats qui provenaient d'une diète seulement. Dans notre étude, nous pouvons nommer deux facteurs qui sont arrivés de façon ponctuelle au cours de l'étude ; la température et les traitements antiparasitaires. Tout d'abord, pour la température,

il a été démontré chez plusieurs espèces que les animaux mangent de plus grande quantité de nourriture lorsqu'ils sont dans des environnements où la température ambiante est plus froide (94-96). La première période de diète a été offerte de mi-février jusqu'à la fin de mars et la seconde, d'avril à mi-mai. Les juments étaient gardées à l'intérieur, mais la température pouvait quand même varier entre la fin de l'hiver et le printemps. Pour la première période de diète, la température plus basse a pu favoriser l'ingestion d'une plus grande quantité de foin, et par le fait même, de fibres. Il a été démontré chez les rongeurs et les humains que la quantité de fibres ingérées a un impact sur l'immunité de l'hôte (5, 23). Malheureusement, le foin était donné à volonté et il n'était pas quantifié, la quantité de fibres ingérées n'est donc pas connue. Nous ne pouvons donc pas établir si la température a eu un impact sur les résultats. Par la suite, les traitements antiparasitaires sont donnés à des temps spécifiques durant l'année, le protocole de gestion exacte des parasites n'est pas connu, mais nous pouvons supposer qu'elles ont reçu un protocole standard qui implique au moins une dose au printemps. La seconde diète a été donnée durant le printemps, il y a de fortes chances qu'une dose antiparasitaire ait été administrée à ce moment-là. Nous ne connaissons pas les effets des antiparasitaires sur l'intestin et il n'y a pas eu de coprologie à la fin de chaque diète, nous ne pouvons donc interpréter l'impact de ceux-ci sur nos résultats.

Pour pouvoir enlever ce biais du temps, une étude avec un protocole d'alimentation en croisé, aurait dû être suivi. Pour ce faire, la moitié des individus aurait suivi la diète 1 pendant que l'autre moitié aurait suivi la diète 2 pour une période de temps. Par la suite, l'inverse doit être fait ; c'est-à-dire que les individus qui suivaient la diète 1 auraient été mis sur la diète 2 et les individus qui suivaient la diète 2 auraient été mis sur la diète 1 pour la même période de temps. Une coprologie à la fin de chaque période de diète aurait aussi été utile pour connaître le statut parasitaire des individus.

Conclusion et perspectives

La présence de cellules immunitaires dans la lamina propria de l'intestin est normale et nécessaire puisque celui-ci est constamment exposé aux nombreux antigènes se trouvant dans la lumière intestinale. Cependant, un déséquilibre dans le type et/ou le nombre de ces cellules mène au développement de certaines maladies, dont les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'interprétation des biopsies endoscopiques peut poser un défi diagnostique puisque, entre autres, la démarcation objective entre la normalité et le dysfonctionnement immunitaire n'est pas clairement établie pour la plupart des MICI de l'espèce équine. L'étude de facteur modifiant l'immunité cellulaire normale de l'intestin permettra de mieux caractériser la population leucocytaire normale et ainsi préciser cette démarcation. Ceci pourra permettre la détection plus précoce d'un changement significatif des cellules immunitaires du duodénum et par extrapolation, de l'intestin grêle. Une détection précoce de MICI a pour but d'offrir une meilleure approche thérapeutique ainsi qu'un meilleur pronostic pour les patients atteints de ces maladies. L'alimentation, un facteur de variation de l'histologie intestinale, est une partie intégrante de l'approche thérapeutique des MICI chez les humains et potentiellement chez les chevaux. Dans ce contexte, il est donc pertinent de présenter la diète la moins immunogénique possible.

Cette étude a permis de démontrer que la caractérisation des lymphocytes par l'immunohistochimie permet d'observer les variations qu'engendrent deux diètes communes chez le cheval sur ces cellules de lamina propria du duodénum. Nous avons ainsi démontré qu'un changement de diète fait varier le ratio de lymphocyte T/lymphocyte B sans modifier le nombre total de lymphocytes. Par contre, le changement de diète ne semble ni affecter les éosinophiles de la lamina propria ni la proportion des mucines acides et neutres du duodénum. L'alimentation présentée aurait donc un impact sur la population de lymphocytes et potentiellement sur le type de réponse inflammatoire que ces cellules peuvent engendrer. Ces notions pourront aider les futures études traitant de l'impact des facteurs de variation sur les leucocytes intestinaux. Ces futures études seront importantes pour établir des valeurs de références de normalité pour pouvoir détecter des changements causés par les MICI.

Plusieurs facteurs ont limité les résultats de cette étude, mais le principal élément limitant est la petite taille de l'échantillon évalué. Effectivement, pour avoir une meilleure puissance statistique ainsi qu'une démarcation plus franche entre les groupes, il aurait fallu étudier un plus grand nombre de biopsies et d'individus. Pour de futures études évaluant l'histologie digestive équine à partir de biopsie duodénale, quelques validations devront être au préalable établies. Tout d'abord, il faudra valider la correspondance entre un diagnostic fait par une biopsie endoscopique avec un diagnostic posé sur une biopsie de pleine épaisseur pour s'assurer de l'interchangeabilité des deux méthodes diagnostiques. Ensuite, il faudra valider la représentativité de l'interprétation d'une biopsie endoscopique provenant du duodénum sur l'ensemble de l'intestin grêle. Pour terminer, il serait souhaitable de valider une échelle de qualité pour les biopsies endoscopiques, en particulier celles provenant du duodénum, pour déterminer le nombre de biopsies nécessaires à l'établissement d'une interprétation objective de l'histologie.

La recherche de l'impact de l'alimentation sur l'immunité de l'hôte est un sujet peu abordé en médecine équine contrairement à la médecine humaine. Vu les conséquences potentielles de l'alimentation sur les leucocytes et sur l'évolution possible vers une maladie inflammatoire et/ou allergique, nous aurions avantage à approfondir ces connaissances pour offrir une meilleure prévention ainsi qu'un meilleur traitement à nos patients.

Bibliographie

1. Yuan Q, Walker WA. Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastro Nutr.* 2004;38(5):463-73.
2. Stewart AS, Pratt-Phillips S, Gonzalez LM. Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the "Leaky Gut" in Health and Disease. *J Equine Vet Sci.* 2017;52:10-22.
3. Boshuizen B, Ploeg M, Dewulf J, Klooster S, Bruijn M, Picavet MT, et al. Inflammatory bowel disease (IBD) in horses: a retrospective study exploring the value of different diagnostic approaches. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):21.
4. Moreau P, Hélie P, Munoz T, Macieira S, Lavoie JP, Jean D. Study of the variability of endoscopic duodenal and rectal biopsies in healthy and heaves-affected horses fed different diets. 2009 ; Unpublished work.
5. Statovci D, Aguilera M, MacSharry J, Melgar S. The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front Immunol.* 2017;8:838.
6. Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases. *Immunity.* 2014;40(6):833-42.
7. Al Jassim RA, Andrews FM. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2009;25(2):199-215.
8. Van Weyenberg S, Sales J, Janssens GPJ. Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. *Livest Sci.* 2006;99(1):3-12.
9. Mair T, Pearson G, Divers T. Malabsorption syndromes in the horse. *Equine Vet Educ.* 2006;18(6):299-308.
10. Blikslager AT, White NA, Moore JN, Mair TS. *The Equine Acute Abdomen.* 3rd ed. Hoboken (NJ) : Wiley; 2017.
11. Cabana T, Baron G, Pflieger JF, rédacteurs. *BIO 2412 : Morphologie microscopique comparée; Histologie animale.* [En ligne]. Montréal : Faculté des arts et sciences, département de sciences biologiques ; Hiver 2014 [Modifié le 31 août 2001 ; cité le 24 juin 2019].

Disponible: <http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Chapitre13.html>

12. Rötting AK, Freeman DE, Constable PD, Eurell JAC, Wallig MA. Mucosal distribution of eosinophilic granulocytes within the gastrointestinal tract of horses. *Am J Vet Res.* 2008;69(7):874-9.
13. Packer M, Patterson-Kane JC, Smith KC, Durham AE. Quantification of immune cell populations in the lamina propria of equine jejunal biopsy specimens. *J Comp Pathol.* 2005;132(1):90-5.
14. Fenoglio-Preiser CM. *Gastrointestinal pathology : an atlas and text.* 3rd ed. Philadelphia (PA): Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
15. Baum B, Meneses F, Kleinschmidt S, Nolte I, Hewicker-Trautwein M. Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: a histologic and immunohistologic study. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):152.
16. Kleinschmidt S, Meneses F, Nolte I, Hewicker-Trautwein M. Distribution of mast cell subtypes and immune cell populations in canine intestines: evidence for age-related decline in T cells and macrophages and increase of IgA-positive plasma cells. *Res Vet Sci.* 2008;84(1):41-8.
17. Palm F, Kuhl J, Walter I, Budik S, Nagel C, Hirt R, et al. Colostrum Withdrawal is Without Effect on Duodenal Development in Newborn Foals. *J Equine Vet Sci.* 2015;35(7):584-90.
18. Monteiro-Steagall B, Steagall P, Lascelles B. Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. *J Vet Intern Med.* 2013;27(5):1011-9.
19. Matsui H, Shimokawa O, Kaneko T, Nagano Y, Rai K, Hyodo I. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;48(2):107-11.
20. Cook VL, Meyer CT, Campbell NB, Blikslager AT. Effect of firocoxib or flunixin meglumine on recovery of ischemic-injured equine jejunum. *Am J vet Res.* 2009;70(8):992-1000.
21. Little D, Brown SA, Campbell NB, Moeser AJ, Davis JL, Blikslager AT. Effects of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on recovery of ischemia-injured equine jejunum. *Am J vet Res.* 2007;68(6):614-24.

22. Handa O, Naito Y, Fukui A, Omatsu T, Yoshikawa T. The impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the small intestinal epithelium. *JJ Clin Biochem Nutr.* 2013;13-84.
23. Montagne L, Pluske JR, Hampson DJ. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim Feed Sci Technol.* 2003;108(1-4):95-117.
24. Field CJ, McBurney MI, Massimino S, Hayek MG, Sunvold GD. The fermentable fiber content of the diet alters the function and composition of canine gut associated lymphoid tissue. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;72(3-4):325-41.
25. Ji Y, Sakata Y, Tso P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(4):315-21.
26. Miura S, Tsuzuki Y, Hokari R, Ishii H. Modulation of intestinal immune system by dietary fat intake: relevance to Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998;13(12):1183-90.
27. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine.* 2010;77(6):552-7.
28. Meeker S, Seamons A, Maggio-Price L, Paik J. Protective links between vitamin D, inflammatory bowel disease and colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(3):933-48.
29. Kerbyson N, Knottenbelt D. Intestinal biopsies for investigating and managing inflammatory bowel disease in horses. *In Practice.* 2015;37(7):347-58.
30. Secombe CJ, Lester GD. The role of diet in the prevention and management of several equine diseases. *Anim Feed Sci Technol.* 2012;173(1-2):86-101.
31. Bulmer L, McBride S, Williams K, Murray J-A. The effects of a high-starch or high-fibre diet on equine reactivity and handling behaviour. *Appl Anim Behav Sci.* 2015;165:95-102.
32. Frape DL. *Equine nutrition and feeding.* 4th ed. Ames, (IA) : Wiley-Blackwell; 2010.
33. Elia JB, Erb HN, Houpt KA. Motivation for hay: effects of a pelleted diet on behavior and physiology of horses. *Physiol Behav.* 2010;101(5):623-7.
34. Darlington J, Hershberger T. Effect of forage maturity on digestibility, intake and nutritive value of alfalfa, timothy and orchardgrass by equine. *J Anim Sci.* 1968;27(6):1572-6.
35. Moore-Colyer M, Longland A. Intakes and in vivo apparent digestibilities of four types of conserved grass forage by ponies. *Anim Sci.* 2000;71(3):527-34.

36. Direction des aliments. Liste des fibres alimentaires évaluées et acceptées par la Direction des aliments de Santé Canada. [En ligne]. Ottawa : Bureau des sciences de la nutrition ; [Modifié le 23 juin 2017 ; cité le 18 novembre 2019]. Disponible : <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/publications/aliments-et-nutrition/liste-fibres-alimentaires-evaluees-acceptees.html>.
37. Mshelia ES, Adamu L, Wakil Y, Turaki UA, Gulani IA, Musa J. The association between gut microbiome, sex, age and body condition scores of horses in Maiduguri and its environs. *Microb Pathog*. 2018;118:81-6.
38. Drogoul C, Tisserand J, Poncet C. Feeding ground and pelleted hay rather than chopped hay to ponies: 2. Consequences on fibre degradation in the cecum and the colon. *Anim Feed Sci Technol*. 2000;87(1-2):131-45.
39. Lybbert T, Gibbs P, Cohen N, Scott B, Sigler D. Feeding alfalfa hay to exercising horses reduces the severity of gastric squamous mucosal ulceration. *Medecine-GI. Proceedings of Americam Association of Equine Practitionners*. 2007:525-6.
40. Cuddeford D, Woodhead A, Muirhead R. A comparison between the nutritive value of short-cutting cycle, high temperature-dried alfalfa and timothy hay for horses. *Equine Vet J*. 1992;24(2):84-9.
41. Puschner B, Chen X, Read D, Affolter VK. Alfalfa hay induced primary photosensitization in horses. *Vet J*. 2016;211:32-8.
42. Orton R, Hume I, Leng R. Effects of exercise and level of dietary protein on digestive function in horses. *Equine Vet J*. 1985;17(5):386-90.
43. Kalck KA. Inflammatory bowel disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2009;25(2):303-15.
44. Kemper D, Perkins G, Schumacher J, Edwards J, Valentin B, Divers T, et al. Equine lymphocytic-plasmacytic enterocolitis: a retrospective study of 14 cases. *Equine Vet J*. 2000;32(S32):108-12.
45. Mansell J, Willard MD. Biopsy of the gastrointestinal tract. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003;33(5):1099-116.

46. WSAVA, Washabau R, Day M, Willard M, Hall E, Jergens A, et al. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J Vet Intern Med.* 2010;24(1):10-26.
47. Willard M, Mansell J, Fosgate G, Gualtieri M, Olivero D, Lecoindre P, et al. Effect of sample quality on the sensitivity of endoscopic biopsy for detecting gastric and duodenal lesions in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2008;22(5):1084-9.
48. Fortier JC, Hould R. *Histotechnologie, théorie et procédés.* Montréal, Québec: Centre collégial de développement de matériel didactique; 2003.
49. Burkitt HG, Young B, Heath JW. *Histologie fonctionnelle de Wheater.* 3rd ed. Paris (FR): Arnette ; 1993.
50. Jones M, Cordell JL, Beyers AD, Tse A, Mason DY. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J Immunol.* 1993;150(12):5429-35.
51. Kalsow CM, Dubielzig RR, Dwyer AE. Immunopathology of pineal glands from horses with uveitis. *Investigative ophthalmology & visual science.* 1999;40(7):1611-5.
52. Kalsow C, Albrecht T, Steinberg N, Lunn D. Antibody selection for immunohistochemical survey of equine tissue. *J Comp Pathol.* 1998;119(4):467-72.
53. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 2011;59(4):356-65.
54. Rossi G, Pengo G, Caldin M, Palumbo Piccionello A, Steiner JM, Cohen ND, et al. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2014;9(4):e94699.
55. German A, Hall E, Day M. Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *J Comp Pathol.* 1999;120(2):129-45.
56. Roth-Walter F, Berger S, Luckschander-Zeller N. *Inflammatory bowel disease in humans, pets, and horses.* Comparative Medicine: Springer; 2017. p. 47-69.

57. Takehana K, Masty J, Yamaguchi M, Kobayashi A, Yamada O, Kuroda M, et al. Fine structural and histochemical study of equine Paneth cells. *Anatomia, histologia, embryologia*. 1998;27(2):125-9.
58. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291-5.
59. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997;91(3):295-8.
60. Beutler B. Innate immunity: an overview. *J Mol Immunol*. 2004;40(12):845-59.
61. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews immunology*. 2013;13(2):145.
62. Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1991;260(2):C183-C93.
63. Croix JA, Carbonero F, Nava GM, Russell M, Greenberg E, Gaskins HR. On the relationship between sialomucin and sulfomucin expression and hydrogenotrophic microbes in the human colonic mucosa. *PLoS One*. 2011;6(9):e24447.
64. Subbuswamy S. Patterns of mucin secretion in human intestinal mucosa. *Journal of anatomy*. 1971;108(Pt 2):291.
65. Sagaert X, De Wolf-Peeters C. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunol Lett*. 2003;90(2-3):179-86.
66. Lunn D. A comparative review of human and equine leucocyte differentiation antigens. *Br Vet J*. 1993;149(1):31-49.
67. Janeway Jr CA. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 1992;10(1):645-74.
68. Waly N, Gruffydd-Jones T, Stokes C, Day M. The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *J Comp Pathol*. 2001;124(2-3):172-82.
69. Essakalli M, Brick C, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Atouf O. Le lymphocyte TH17 dernier-né de la famille des lymphocytes CD4+. *Pathol Biol*. 2010;58(6):437-43.

70. Mosmann TR, Coffman R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7(1):145-73.
71. Caricilli AM, Castoldi A, Câmara NOS. Intestinal barrier: a gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *World J Gastroenterol*. 2014;5(1):18.
72. Olofsson KM, Hjertner B, Fossum C, Press CM, Lindberg R. Expression of T helper type 17 (Th17)-associated cytokines and toll-like receptor 4 and their correlation with Foxp3 positive cells in rectal biopsies of horses with clinical signs of inflammatory bowel disease. *Vet J*. 2015;206(1):97-104.
73. Beekman L, Tohver T, Leguillette R. Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J Vet Internal Med*. 2012;26(1):153-61.
74. Regan DP, Aarnio MC, Davis WS, Carmichael KP, Vandenplas ML, Lauderdale JD, et al. Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*. 2012;15(3):145-52.
75. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.
76. Mason DY, Cordell JL, Brown MH, Borst J, Jones M, Pulford K, et al. CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*. 1995;86(4):1453-9.
77. Mason D, Comans-Bitter W, Cordell J, Verhoeven M, Van Dongen J. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Pathol*. 1990;136(6):1215.
78. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol*. 2004;16(1):119-29.
79. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry A*. 1993;14(2):196-204.
80. Warzynski MJ, Graham DM, Axtell RA, Zakem MH, Rotman RK. Low level CD20 expression on T cell malignancies. *Cytometry A*. 1994;18(2):88-92.

81. Olofsson KM. Immunopathological Aspects of Equine Inflammatory Bowel Disease [Thèse]. Uppsala (SE): University of Agricultural Sciences; 2016.
82. Durham A, Pillitteri C, Myint MS, Valli V. Two hundred three cases of equine lymphoma classified according to the World Health Organization (WHO) classification criteria. *Vet Pathol.* 2013;50(1):86-93.
83. Benarafa C, Cunningham FM, Hamblin AS, Horohov DW, Collins ME. Cloning of equine chemokines eotaxin, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, MCP-2 and MCP-4, mRNA expression in tissues and induction by IL-4 in dermal fibroblasts. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000;76(3-4):283-98.
84. Gleich GJ, Loegering DA. Immunobiology of eosinophils. *Annu Rev Immunol.* 1984;2(1):429-59.
85. Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity.* 2014;40(4):582-93.
86. Forman R, Bramhall M, Logunova L, Svensson-Frej M, Cruickshank SM, Else KJ. Eosinophils may play regionally disparate roles in influencing IgA+ plasma cell numbers during large and small intestinal inflammation. *BMC immunology.* 2016;17(1):12.
87. Meyerholz DK, Griffin MA, Castilow EM, Varga SM. Comparison of histochemical methods for murine eosinophil detection in an RSV vaccine-enhanced inflammation model. *Toxicol Pathol.* 2009;37(2):249-55.
88. Honneffer JB, Minamoto Y, Suchodolski JS. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16489.
89. Mackie RI, Wilkins C. Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(9):2155-60.
90. Milinovich GJ, Klieve AV, Pollitt CC, Trott DJ. Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. *Vet Clin Equine Pract.* 2010;26(1):79-94.
91. La Perle K, Piercy R, Long J, Blomme E. Multisystemic, eosinophilic, epitheliotropic disease with intestinal lymphosarcoma in a horse. *Vet Pathol.* 1998;35(2):144-6.

92. McCue ME, Davis EG, Rush BR, Cox JH, Wilkerson MJ. Dexamethasone for treatment of multisystemic eosinophilic epitheliotropic disease in a horse. *J Am Vet Med Asso.* 2003;223(9):1320-3.
93. Schumacher J, Edwards JF, Cohen ND. Chronic idiopathic inflammatory bowel diseases of the horse. *J Vet Intern Med.* 2000;14(3):258-65.
94. Hamilton C. Interactions of food intake and temperature regulation in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1963;56(3):476.
95. Hamilton C, editor Interactions of water, food and temperature regulation in the monkey. *Thirst, An International Symposium*; 1964: Pergamon Press Oxford.
96. Ingram D, Legge K. Effects of environmental temperature on food intake in growing pigs. *Comp Biochem Physiol A: Physiol.* 1974;48(3):573-81.

Annexe I : Protocole immunohistochimique pour CD3 et CD20

Matériel

Équipements

- Incubateur 37 °C
- Decloaking chamber (Intermedico)
- Bains de coloration (7)
- Coplins (3)
- Cylindres gradués
- Pipettes automatiques 5 mL, 10 mL, 15 mL
- Tubes de 10 mL (8)
- Papier doux Kimwipe
- Support à lame
- Pipettes et embouts à pipette 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L
- Chambre humide
- Entonnoir
- Chronomètre
- pH-mètre
- Balance
- Pipette en plastique
- Bêchers
- Lamelles
- Plaque agitatrice
- Bouteilles 2L, 1L
- Aimants

Produits chimiques et biologiques

- Xylène (534056, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Éthanol 100%
- Éthanol 95%
- Éthanol 80%
- Eau distillée
- Eau millipore
- Citrate de sodium
- Peroxyde d'hydrogène 30% (H1009, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Sérum de cheval (S-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Chlorure de Sodium, NaCl (Fisher, S271-2, Rockford, IL, USA)
- Chlorure de potassium, KCl
- Phosphate de potassium monobasique, NaHPO₄
- Phosphate de sodium dibasique, Na₂HPO₄ (S3397, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Mouse monoclonal anti-CD3 (Dako, M7254, Mississauga, ON, USA)
- Rabbit polyclonal anti-CD20 (Fisher, PA5-16701, Rockford, IL, USA)
- Anticorps secondaire de cheval anti souris/lapin couplé biotine (BA-1400, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Sérum de chèvre (#053110, Multicell Wisent, St-Bruno, QC, CAN)
- Vectastain ABC Elite kit (PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Peroxydase substrate kit AEC (SK-4200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Hématoxyline de Mayer's (MHS16, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Aquamount (Fisher, 14-390-5, Rockford, IL, USA)
- Crayon hydrophobe (H-4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Solutions

Saline de Phosphate tamponnée (PBS) 10X (1L)

80 g NaCl	14,4 g Na ₂ HPO ₄	Mettre le tout dans 1 L d'eau millipore et ajuster à un pH de 7 avec HCl ou NaOH
2 g KCl	2,4 g KH ₂ PO ₄	

Tampon 10mM Citrate de Sodium 1X (1L)

2,94 g citrate de sodium	Mélanger le citrate avec 900 mL d'eau millipore et ajuster à un pH de 6 avec HCl ou NaOH. Une fois le pH atteint, ajouter 100 mL d'eau millipore.
1000 mL d'eau millipore	

Protocole

Jour 1 : Exemple pour 10 lames dont 5 pour CD3 et 5 pour CD20.

- **Identification des lames :**
 - Date. # bloc. Coloration
 - Les placer en incubation à 37 °C pour la nuit.
- **Déparaffinage et réhydratation :**

Plonger les lames dans les bains contenant les solutions. À changer à chaque 100 lames.

- Xylène 5 min
- Éthanol 100% 2 min
- Éthanol 95% 2 min
- Éthanol 80% 2 min
- Mettre dans un bain d'eau distillée

3) Démasquage de l'antigène

- CD3/CD20 :
 - Utiliser le Decloaking chamber.
 - 45 mL eau distillée + 5 mL de citrate 10X pour un coplin. (x2 pour 10 lames)
 - Mettre 3 coplins (eau distillée dans ceux sans lames pour balancer)
 - Mettre 500 mL d'eau au fond et fermer le couvercle
 - Mettre ON, peser sur display set jusqu'à ce que SP1 s'allume
 - Peser START et flèche par en bas.

- Une fois température atteinte, peser sur START (la lumière SP2 s'allume) attendre que ça sonne et repeser sur START.
- Une fois les lames refroidies, vider les coplins et mettre du PBS pour rincer et vider rapidement. Remettre du PBS et laisser tremper 15 min. Prendre le temps de délimiter les biopsies avec le crayon hydrophobe.

4) Blocage peroxydase endogène :

Cette étape peut se faire durant l'incubation mais il faut boucher l'éprouvette.

- Mettre 1 mL de peroxyde 30% dans 9 μL eau distillée, mélanger.
- Essuyer le dessous et au pourtour des lames avec un Kimwipe
- Pipetter 200 μL de la solution sur chaque lame. Partir le chronomètre dès la 1ere lame pour 5 min.
- Après 5 min, mettre dans un bain de PBS, vider rapidement et remettre du PBS pour 5 min.

5) Blocage avec sérum de cheval :

Calculer environ 200 μL par lames. Dilution de 1:20

- 1900 μL de PBS + 100 μL de sérum de cheval normal, mélanger.
- Égoutter la lame, essuyer au pourtour et en dessous avec des Kimwipes
- Mettre 200 μL et bien recouvrir, incuber à plat à 25 °C pour 30 min.

6) Anticorps primaire :

Dilution de 1:200 pour CD3 et de 1:400 pour CD20. 200 μL pour bien recouvrir la lame. Pour le contrôle négatif -> utiliser le sérum de chèvre selon la dilution de l'anticorps choisi.

- 4 μL de CD3 + 796 μL de PBS (1 μL sérum de chèvre + 199 μL PBS)
- 2 μL de CD20 + 798 μL de PBS (0,5 μL sérum de chèvre + 199,5 μL PBS)
- Égoutter, essuyer au pourtour et en dessous de la lame avec un Kimwipe
- Mettre l'anticorps dilué et incuber à plat dans une chambre humide toute la nuit à 4 °C

Jour 2

7) Anticorps secondaire :

200 μL par lames, il faut une dilution 1:200 pour anticorps secondaire de cheval anti souris/lapin couplé biotine pour les lames CD3 et une dilution de 1:400 pour les lames CD20.

- 995 μL de PBS + 5 μL d'anticorps, mélanger pour CD3.
- 997,5 μL de PBS + 2,5 μL d'anticorps, mélanger pour CD20.
- Égoutter, essuyer au pourtour et en dessous de la lame avec un Kimwipe
- Mettre la solution avec l'anticorps secondaire et incuber à plat à 25 °C dans chambre humide pour 30 min.

8) Réactif ABC :

Pour 30 lames. Préparation au moins 30 min à l'avance

- Mettre 5 mL de PBS dans éprouvette
- Ajout de 2 gouttes du réactif A
- Ajout de 2 gouttes du réactif B

- Mélanger.
- Une fois l'incubation terminée, mettre dans un bain de PBS, vider rapidement et remettre du PBS pour 5 min.
- Égoutter, essuyer au pourtour et en dessous de la lame avec un Kimwipe
- Couvrir avec le réactif et incuber à plat à 25 °C dans chambre humide pour 30 min.

9) Réactif AEC :

NE PAS PRÉPARER PLUS QUE 5 MIN À L'AVANCE. AEC cancérigène -> jeter proprement.

- Une fois l'incubation terminée, mettre dans un bain avec du PBS, vider rapidement et remettre du PBS pour 5 min.
- 5 mL d'eau distillée dans une éprouvette + 2 gouttes de buffer
- 3 gouttes AEC
- 2 gouttes de peroxyde et mélanger.
- Égoutter, essuyer au pourtour et en dessous de la lame avec un Kimwipe
- Couvrir avec le réactif et incuber à plat à 25 °C dans la chambre humide pour 15 min.

10) Contre-coloration Hématoxyline de Mayer's et montage :

1. Égoutter les lames et les déposer sur un support à lame au dessus d'un évier
2. Rincer à l'eau distillée pendant 2-3 min.
3. Enlever l'eau de deux lames à la fois et couvrir les lames de colorant pendant 25 secondes.
4. Rincer à l'eau distillée et mettre dans un bain d'eau distillée pendant 10 min.
5. Réchauffer l'Aquamount pendant ce temps dans de l'eau chaude.
6. Après incubation, égoutter, essuyer au pourtour et en dessous de la lame avec un Kimwipe
7. Mettre 2 gouttes d'Aquamount et déposer une lamelle

Annexe II : Protocole Hématoxyline-éosine-phloxine-safran

Matériel

Équipements

- Plaque agitatrice
- Balance
- Bains de coloration
- Cylindres gradués
- Aimant
- Béchers
- Bouteilles 1 L, 500 mL
- Lamelles
- Sèche-lame
- Support à lame
- Filtre Whatman

Produits chimiques

- Acide acétique glaciale (Fisher, A38-212)
- Eau distillée
- Acide chlorhydrique
- Carbonate de lithium
- Acide périodique (EMS, 19325)
- Éosine Y
- Phloxine B
- Xylène (534056, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Éthanol 100%
- Éthanol 95%
- Éthanol 80%
- Réactif de Schiff (3952016, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Colle Micromount (Leica Biosystems, Richmond, IL, USA)
- Solution Safran Gatinais

Solutions

Solution alcool chlorhydrique 1%

990 mL d'éthanol 100% Mélanger les deux ingrédients ensemble.
10 mL de HCl

Carbonate de lithium

15 g Carbonate de lithium Mélanger sur la plaque agitatrice et filtrer avec un filtre Whatman.
1000 mL d'eau distillée

Éosine 1%

10 g éosine Y Mettre un aimant et mélanger sur la plaque agitatrice.
1000 mL d'eau distillée

Phloxine 1%

1 g phloxine B Mettre un aimant et mélanger sur la plaque agitatrice.
100 mL d'eau distillée

Safran

225 mL Safran Mélanger.
700 mL d'éthanol 100%

Éosine-Phloxine

100 mL d'éosine 1% Mélanger les 3 premiers et ajouter acide acétique glaciale
10 mL de phloxine 1%
780 mL d'éthanol 75%
4 mL d'acide acétique glaciale

Coloration HEPS

1. Déparaffinage :

Plonger les lames dans les bains contenant les solutions

- Xylène 10 min
- Éthanol 100% 2 min
- Éthanol 95% 2 min
- Éthanol 80% 2 min
- Mettre dans l'eau distillée 2 min

2) Coloration : Colorer avec hématoxyline de Harris 6 min.

3) Lavage : Laver à l'eau 10 trempettes.

4) Acide chlorhydrique : 4 trempettes de 2 secondes.

5) Lavage : Laver à l'eau courante 10 trempettes.

6) Carbonate de lithium : 20 secondes

7) Lavage : Laver les lames à l'eau 10 trempettes.

8) Éthanol 70% : Bain pendant 1 min 30 secondes

9) Éosine-Phloxine : Bain pendant 4 min 30 secondes

10) Déshydrater : Plonger les lames dans des bains

- Éthanol 95% 2 min
- Éthanol 95% 2 min
- Éthanol 100% 2 min
- **Safran :** 4 min
- Éthanol 100% 2 min
- Xylène final 5 min

9) Monter les lames avec la colle Micromount et mettre dans le sèche-lame.

Annexe III : Protocole de coloration AB PAS

Matériel

Équipements

- Plaque agitatrice
- Balance
- pH-mètre
- Bains de coloration (11)
- Cylindres gradués
- Aimant
- Béchers
- Pipette automatique de 5 mL
- Bouteilles 1 L, 500 mL
- Lamelles
- Sèche-lame
- Support à lame
- Filtre Whatman

Produits chimiques

- Acide acétique glaciale (Fisher, A38-212, Rockford, IL, USA)
- Eau distillée
- Bleu alcian 8GX
- Thymol en cristaux (T0501, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Acide périodique (EMS, 19325)
- Xylène (534056, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Éthanol 100%
- Éthanol 95%
- Éthanol 80%
- Réactif de Schiff (3952016, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)
- Colle Micromount (Leica Biosystems, Richmond, IL, USA)

Solutions

Eau acétifiée 3%

4,5 mL acide acétique
150 mL d'eau distillée

Mélanger les deux ingrédients ensemble.

Solution Alcian Bleu

1 g Alcian Bleu 8GX
100 mL d'eau acétifiée
15 mg thymol en cristaux

Mettre 1 g d'alcian bleu 8GX avec 100 mL eau acétifiée. Ajouter 15 mg de thymol en cristaux. Ajuster le pH à 2,5 avec de l'acide acétique 3%. Mélanger et filtrer avec un filtre Whatman. Mettre la solution au frigo.

Solution acide périodique 1%

5 g acide périodique
500 mL d'eau distillée

Mélanger l'acide périodique à l'eau distillée. Mettre un aimant et mélanger sur la plaque agitatrice.

Protocole

- **Déparaffinage :**

Plonger les lames dans les bains contenant les solutions

- Xylène 10 min
- Éthanol 100% 2 min
- Éthanol 95% 2 min
- Éthanol 80% 2 min
- Mettre dans l'eau distillée 2 min

2) **Coloration :** Colorer dans la solution Alcian Bleu 30 min.

3) **Lavage :** Laver à l'eau courante pendant 5 min.

4) **Acide :** Placer les lames dans l'acide périodique 1% pendant 10 min.

5) **Lavage :** Laver à l'eau courante pendant 5 min.

6) **Acide :** Mettre les lames sur un support et recouvrir de réactif de Schiff du frigo pendant 10 min.

7) **Lavage :** Laver les lames à l'eau courante pendant 10 min.

8) **Déshydrater :** Plonger les lames dans des bains

- Éthanol 95% 2 min
- Éthanol 95% 2 min
- Éthanol 100% 2 min
- Éthanol 100% 2 min
- Xylène final 5 min

9) Monter les lames avec la colle Micromount et mettre dans le sèche-la

Annexe IV : Score de qualité des biopsies endoscopiques

Tableau V. Score de qualité donnée à chaque biopsie endoscopique

Numéro de la jument	Diète	CD3	CD20	HEPS
84	1	2.a	2.a	2.a
	2	1.a	1.a	2.a
87	1	3	1.a	2.a
	2	2.a	2.a	2.a
323	1	2.a	2.a	2.a
	2	2.a	1.a	3
325	1	3	2.a	1.a
	2	2.a	3	3
328	1	3	3	3
	2	2.a	1.a	3
329	1	1.a	2.a	1.a
	2	2.a	3	2.b
324	1	1.a	2.a	2.c
	2	-	-	-

CD3 = Les scores donnés aux biopsies marquées par le CD3.
 CD20 = Les scores donnés aux biopsies marquées par le CD20.
 HEPS = Les scores donnés aux biopsies colorées à l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran.

Annexe V : Comptes exacts des lymphocytes T, B et éosinophiles.

Tableau VI. Évaluations quantitatives des lymphocytes T de la lamina propria de biopsie endoscopique duodénale de chevaux sains pour les deux diètes.

Numéro de la jument	Comptes de lymphocytes T (LT/10 000 μm^2)	
	Diète 1	Diète 2
84	11,33	14,07
87	9,34	12,33
323	7,97	9,83
325	6,18	4,86
328	10,48	6,72
329	5,91	17,52
324	9,70	-
Moyenne	8,70	10,89

Tableau VII. Évaluations quantitatives des lymphocytes B de la lamina propria de biopsie endoscopique duodénale de chevaux sains pour les deux diètes.

Numéro de la jument	Comptes de lymphocytes B (LB/10 000 μm^2)	
	Diète 1	Diète 2
84	7,04	3,15
87	11,70	7,56
323	4,85	2,24
325	5,40	7,45
328	10,29	3,01
329	7,06	5,34
324	7,85	-
Moyenne	7,74	4,79

Tableau VIII. Évaluations quantitatives des éosinophiles de la lamina propria de biopsie endoscopique duodénale de chevaux sains pour les deux diètes.

Numéro de la jument	Comptes d'éosinophiles (éosinophiles/mm ²)	
	Diète 1	Diète 2
84	601,63	316,38
87	30,98	43,64
323	33,11	10,13
325	0	18,07
328	3,67	5,01
329	0	36,92
324	2,21	-
Moyenne	95,94	71,69