



UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR – STRASBOURG

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Physiologie et biologie des organismes

Présentée et soutenue publiquement par

François REICHARDT

Le 21 Novembre 2008

Ingestion spontanée d'argiles chez le rat : rôle dans la physiologie intestinale.

Jury

Professeur Jean-Louis GENDRAULT, Université de Strasbourg	Président
Professeur Jocelyne BRENDLÉ, Université de Haute-Alsace	Rapporteur
Docteur Vassilia THEODOROU, INRA Toulouse	Rapporteur
Docteur Nicole LIEWIG, CNRS Strasbourg	Directeur de Thèse
Docteur Jean-Hervé LIGNOT, Université de Strasbourg	Examineur
Docteur Norbert CLAUER, CNRS Strasbourg	Examineur
Docteur Yvon LE MAHO, CNRS Strasbourg	Membre Invité

REMERCIEMENTS

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de lire mon manuscrit de thèse et d'assister à ma soutenance.

Merci à Nicole Liewig et Jean-Hervé Lignot pour m'avoir permis de faire cette thèse sur un sujet si intéressant, pour m'avoir fait confiance, conseillé et soutenu à chaque moment durant ces trois années.

Merci à Fabielle Angel pour son aide dans la finalisation de ces travaux et la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Yvon Le Maho et à Stéphane Blanc pour nous avoir soutenus au cours de ces trois années et de nous avoir permis de justifier l'intérêt de la pluridisciplinarité.

Merci à Valérie Demais pour sa patience, son implication et son aide essentielle dans les analyses microscopiques et la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Jean-Patrice Robin pour m'avoir apporté une grande aide dans les analyses de composition corporelle comme dans la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Caroline Habold pour sa contribution essentielle à ce projet et ses précieux conseils.

Merci à Laurence Sabatier et Bertrand Chaumande pour leur collaboration dans ce projet passionnant et pour m'avoir fait confiance.

Merci à Sylvie Massemin, Anne Boos et Monique Miehé pour leurs gentillesse et leurs aides précieuses.

Merci à Alain Ackermann pour son aide et ses excellentes remarques.

Merci à Jaqueline Brenckle, Brigitte Gaillard et Martine Schneider pour leurs gentillesse, leurs disponibilités et l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée au cours de ces trois années.

Merci à Aurélie Hranitsky et Sophie Calibre pour s'être occupées avec amour des rats géophages, et à Lucille Mouyen, Luc Harr et Steven Winling pour leurs aides précieuses sous la hotte et à l'animalerie.

Merci au D.E.P.E et à tous ses occupants, humains ou non.

Merci au G.F.A. et à la S.E.B. pour nous avoir permis de présenter nos travaux à de nombreuses reprises.

Merci à Jean-Marc Péquignot pour son enthousiasme il y a quatre ans et ses conseils.

À Caroline, Isabelle, Valérie, Alexandre, Damien, Nicolas et Yannick.
À ma famille.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS	3
INTRODUCTION	5
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	7
1. <i>L'INGESTION D'ARGILE</i>	9
2. <i>ARGILES ET MINÉRAUX ARGILEUX</i>	19
3. <i>LA PHYSIOLOGIE DE L'ABSORPTION INTESTINALE</i>	29
BUT DE L'ÉTUDE	51
MATÉRIELS ET MÉTHODES	53
4. <i>EXPÉRIMENTATION ANIMALE</i>	55
5. <i>MÉTHODES ANALYTIQUES</i>	61
RÉSULTATS	71
6. <i>CONSOMMATIONS – GAIN DE MASSE</i>	73
7. <i>OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES</i>	83
8. <i>DOSAGES</i>	137
DISCUSSION	141
9. <i>DISCUSSION</i>	143
CONCLUSION – PERSPECTIVES	175
<i>CONCLUSION</i>	177
<i>PERSPECTIVES</i>	181
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183
LISTE DES FIGURES	201
LISTE DES TABLEAUX	203
ANNEXES	205
TABLE DES MATIÈRES	219

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Vocabulaire technique :

Apo-AI	apolipoprotéine AI
Apo-AIV	apolipoprotéine AIV
CSEM	<i>conventional scanning electron microscopy</i> microscopie électronique à balayage en mode haut vide
ESEM	<i>environmental scanning electron microscopy</i> microscopie électronique à balayage en mode pression variable
EDX	<i>energy dispersive X-Ray spectrometry</i> spectrométrie en dispersion d'énergie de photon X
ELISA	<i>enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i> dosage immuno-enzymatique sur support solide
FABP	<i>fatty acid binding protein</i> protéines de transport des lipides dans les entérocytes
FATP	<i>fatty acid transport protein</i> protéine de fixation des lipides dans les entérocytes
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer</i> spectromètre de masse à source plasma.
MEB	microscopie électronique à balayage
Kao	kaolinite
MC	microscopie confocale
MET	microscopie électronique par transmission
MMT	montmorillonite
MP	microscopie photonique
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> solution de tampon phosphate
PFA	paraformaldéhyde
PYY	peptide YY
RER	réticulum endoplasmique rugueux
REL	réticulum endoplasmique lisse

Codes animaux

NF	<i>Normally-Fed</i> nourriture standard <i>ad libitum</i>
P3	phase III du jeûne
Kao	complémenté en kaolinite <i>ad libitum</i>
MMT	complémenté en montmorillonite <i>ad libitum</i>
NF14	nourriture standard pendant 14 jours
NF28	nourriture standard pendant 28 jours
NF14(-)	nourris pendant 14 jours avec 75 % de la quantité de nourriture ingérée par les NF14
NF+P3	jeûné jusqu'en phase III sans complémentation
RéaNF	normalement nourris pendant la réalimentation
RéaNF(-)	réalimentés avec la même quantité de croquettes que celle ingérée par les RéaKao2
Kao7	complémenté en kaolinite pendant 7 jours
Kao14	normalement nourris en présence de kaolinite pendant 14 jours
Kao14(-)	nourris pendant 14 jours en présence de kaolinite avec 75 % de la quantité de nourriture ingérée par les NF14
Kao28	complémentés en kaolinite pendant 28 jours
Kao7+P3	complémentés en kaolinite pendant 7 jours puis jeûne jusqu'en phase III
Kao7+P3Kao	complémentés en kaolinite pendant 7 jours puis jeûne jusqu'en phase III en présence de kaolinite
RéaKao1	réalimentés avec complémentation en kaolinite durant l'expérience 3a
RéaKao2	réalimentés avec complémentation en kaolinite durant l'expérience 3b
RéaKao	fusion des groupes RéaKao1 et RéaKao2
MMT28	complémentés en montmorillonite pendant 28 jours

Code des expériences :

- Expérience 1a alimentation standard complétée en kaolinite *ad libitum* pendant 7 et 28 jours
(NF28, Kao7 et Kao28)
- Expérience 1b alimentation standard complétée en kaolinite ou en montmorillonite *ad libitum* pendant 28 jours
(NF28, Kao28 et MMT28)
- Expérience 2 jeûne jusqu'en phase III avec complément en kaolinite *ad libitum*
(NF+P3, Kao7+P3Kao et Kao7+P3)
- Expérience 3a réalimentation libre avec complément en kaolinite *ad libitum* après un jeûne jusqu'en phase III
(RéaNF et RéaKao1)
- Expérience 3b réalimentation avec complément en kaolinite *ad libitum* après un jeûne jusqu'en phase III
(le groupe témoin a une alimentation restreinte contrôlée/imposée)
(RéaKao2 et RéaNF(-))
- Expérience 4 alimentation restreinte de 25 % avec complément en kaolinite *ad libitum*
(NF14, Kao14, NF14(-), Kao14(-))

INTRODUCTION

Depuis toujours, le monde vivant a su tirer profit des sols riches en argiles, sur lequel il vit et dont il se nourrit. Dans la Nature, l'utilisation des éléments du sol est ainsi un comportement spontané largement répandu, observé chez de nombreux animaux y compris l'Homme. Composants universellement répandus, les argiles et minéraux argileux sont utilisés dans le monde animal au travers de pratiques variées, démontrant notamment leurs **propriétés curatives**. L'une des plus décrites est l'**application cutanée** d'argiles humides sur des tissus blessés afin d'en faciliter la cicatrisation, propriété que l'on retrouve en médecine humaine dans les cataplasmes depuis maintenant plus de deux millénaires (Tateo et Summa, 2006). Une autre utilisation naturelle des argiles, fréquemment observée, est la **géophagie** ou l'**ingestion volontaire de terre**. Beaucoup d'études faites sur l'Homme comme sur l'animal ont montré que la pratique de la géophagie permettait de traiter des **troubles digestifs** divers, et pouvait ainsi expliquer sa persistance au cours de l'évolution.

Si l'ingestion spontanée d'argile dans le milieu naturel a été et est abondamment décrite et si son utilisation en médecine humaine semble évidente, il existe cependant peu de réponses quant aux mécanismes mis en jeu lors du passage des argiles dans l'intestin, organe essentiel dans la digestion et responsable de l'absorption des aliments. Le fait que la consommation d'éléments issus des sols ne semble ni involontaire ni fortuite, mais recherchée et variable selon l'état physiologique du sujet justifie l'intérêt scientifique pour ce comportement, dont les bénéfices sont décrits avec abondance dans la littérature. Aujourd'hui, la « géologie médicale » apparaît comme un domaine de recherche et de connaissances nouveau permettant d'établir des relations de cause à effet entre l'environnement géologique et les problèmes de santé chez les humains, les animaux et les plantes (Gomes et Silva, 2007).

Le but de cette étude est d'essayer d'apporter des connaissances nouvelles sur **la nature des interactions entre les argiles et la muqueuse intestinale et leurs rôles dans la physiologie digestive** après ingestion spontanée chez des rongeurs, et d'acquérir ainsi un nouvel éclairage sur une pratique ancestrale et empirique, mais pourtant capable d'offrir de multiples applications médicales.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1. L'INGESTION D'ARGILE

1.1. La géophagie

A. Définition

La géophagie est définie comme l'**ingestion active de matière terreuse trouvée dans les sols, généralement riche en argiles, et issue de la dégradation des roches**. Le mot géophagie est dérivé du mot géophage (venant du grec *phagein*, manger, et de *ge*, terre), illustrant un comportement commun observé dans des régions géographiquement différentes (Laufer, 1930). Ce phénomène, très répandu chez les Vertébrés, est retrouvé chez les Reptiles (Marlow et Tollestrup, 1982), les Oiseaux (Diamond, 1999; Gilardi et al., 1999), et de nombreuses espèces de Mammifères (Pages et al., 2005), incluant les Primates non humains (Aufreiter et al., 2001) et humains (Mascolo et al., 1999). La persistance de la géophagie lors de l'évolution semble liée au fait que cette pratique contribue à la santé (Klein et al., 2008).

B. La géophagie dans la Nature

Spontanée et volontaire, la géophagie animale semble **instinctive**. Elle peut être régulière mais s'observe aussi ponctuellement en situation de carences alimentaires (Diamond, 1999). Des comportements de géophagie volontaire ont été observés chez certains **Reptiles**, notamment la tortue du désert (*Gopherus agassizi*), qui creuse pour enfouir ses œufs et consomme en même temps une partie du sol qu'elle déblaie (Marlow et Tollestrup, 1982). Chez les **Oiseaux**, la géophagie a été observée chez les oies (*Anser anser*), les perroquets (famille des *Psittacidae*), les pigeons (genre *Columba*), ainsi que chez certains Passériformes.



Figure 1. Aras rouges et bleus (*Ara macao* et *Ara rauna*) consommant de l'argile sur un affleurement de falaise en Amazonie. (Photo Christian D. Müller)

L'ingestion de terre permettrait de réduire la biodisponibilité des poisons, des alcaloïdes et des tannins (Diamond et al., 1999 ; Gillardi et al, 1999). Certains auteurs ont avancé que l'ingestion de terre aurait comme finalité d'augmenter les capacités de broyage de l'estomac. Il a été montré par exemple que l'augmentation de la taille des particules entraîne généralement un allongement du temps de transit total du fait d'une rétention plus longue dans le gésier (Carré, 2000). Mais lors du suivi de nombreuses espèces d'oiseaux consommant des sols riches en argile, il a été constaté que les terres ingérées préférentiellement étaient composées de particules de trop petite taille pour faciliter le broyage mécanique de la nourriture (Brightsmith et Muñoz-Najar, 2004).

L'ingestion active de terre est un comportement commun des **Mammifères** en liberté observé dans différentes régions et les terres ingérées sont souvent spécifiques d'une zone bien délimitée (Wilson, 2003). Les éléphants des forêts humides tropicales d'Afrique centrale (*Loxodonta cyclotis*), par exemple, consomment uniquement la terre provenant d'un lieu bien précis (Klaus et Schmid, 1998). Il semble que seules les espèces carnivores strictes ne soient pas géophages (Klaus et Schmid, 1998). Chez les animaux d'élevage, la géophagie est souvent observée dans les zones de pâturages, notamment chez les bovins et les ovins qui possèdent des aires sélectionnées où trouver de la terre comestible (Trckova et al., 2004).



Figure 2. Chimpanzé (*Pan troglodytes*) ramassant la terre d'une termitière.
(Photo M. Huffman, d'après Aufreiter et al., 2001)

La géophagie est particulièrement répandue chez les **singes** qui consomment de la terre sélectionnée à partir de quelques sites précis (Aufreiter et al., 1997 ; Krishnamani et Mahaney, 2000 ; Wilson, 2003 ; Pages et al., 2004 ; Ferrari et al., 2008). Les chimpanzés (*Pan troglodytes*) du Parc National des montagnes de Mahale, en Tanzanie, consomment uniquement la terre provenant des termitières (Mahaney et al., 1999). Les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) de l'île portoricaine de Cayo Santiago consomment la terre provenant de galeries qu'ils ont excavées (Knezevich, 1998). Les makis (*Lemur catta*) du zoo de Thoiry choisissent la terre qu'ils consomment sur des affleurements ou sur des monticules de terre fraîchement retournés (Knezevich, 1998).

La géophagie pourrait refléter dans ce cas la recherche d'une supplémentation minérale, bien que certains sols ingérés soient pauvres en minéraux essentiels pour le métabolisme (Heymann et Hartmann, 1991 ; Wakibara et al., 2001 ; De Souza et al., 2002), et/ou permettre d'éliminer les toxines de la nourriture ingérée (Müller et al., 1997 ; Wakibara et al., 2001 ; Dominy et al., 2004). En plus de ces hypothèses « reminéralisantes », il a été montré récemment que le chimpanzé ingère des sols contenant de la kaolinite - une argile universellement répandue - afin de potentialiser les effets de molécules antipaludéennes contenues dans les feuilles d'un arbre de la famille de l'acajou, le *Trichilia rubescens* (Klein et al., 2008).



Figure 3. Singe hurleur (*Alouatta palliata*) consommant de l'argile sur un affleurement de falaise en Amazonie. (Photo Christian D. Müller)

C. La géophagie humaine

Les premières traces de « géophagie médicinale » remontent à plus de deux mille ans avant notre ère, en Chine, en Egypte et chez les Sumériens, où l'argile était vendue sur les marchés pour être consommée selon ses vertus supposées (Danford, 1982). L'ingestion d'argile était alors prescrite pour améliorer le bien-être des convalescents et des bien-portants. Son usage s'est vulgarisé par la suite. L'argile a ainsi été reconnue comme un médicament indispensable depuis un millier d'années. Au cours des siècles, la géophagie a été considérée tour à tour comme un trouble psychiatrique, une pratique culturelle ou une séquelle de la pauvreté et de la famine, et serait pour certains auteurs à la fois un symptôme et une cause d'importantes carences (Rainville, 1988 ; Woywodt, 2002). La terre est toujours consommée aujourd'hui dans de nombreux pays, où des facteurs alimentaires, médicaux, psychologiques et culturels jouent un rôle important dans la compréhension de cette pratique (Klein et al., 2008).

Au niveau anthropologique, la géophagie a beaucoup été étudiée en Amérique du nord chez les Indiens, chez les Afro-américains du sud des Etats-Unis et chez certaines populations rurales du Mexique (Patterson et Staszak, 1977 ; Simon, 1998 ; Luoba et al., 2005). Ce comportement a également été retrouvé au Moyen-Orient, en Asie (Inde, Chine, Indonésie) et

en Océanie (Aufreiter et al., 1997). En Afrique, de nombreuses tribus pratiquent toujours la géophagie, comme par exemple au Liberia, au Ghana, en Ouganda, au Kenya et au Zimbabwe (Vermeer et Ferrell, 1985 ; Abrahams, 1997 ; Aufreiter et al., 1997 ; Geissler et al., 1998 a, b). Dans toutes ces régions et de façon constante, l'ingestion d'argile est une pratique particulièrement importante chez les enfants et les femmes enceintes ou allaitantes, ceci notamment afin d'éviter les effets négatifs associés aux diarrhées (Simon, 1998 ; Geissler et al., 1998 a, b ; Trckova, 2004 ; Luoba et al., 2005). Avec ses effets positifs sur la santé, la géophagie influencerait l'habitat des populations dans des régions où il existe des sites d'approvisionnement.



Figure 4. Vente de médicaments à base d'argile dans un marché en Ouganda. (D'après Abrahams, 1997)

La géophagie trouve aussi ses origines dans différentes motivations comme le soulagement de la sensation de faim en période de famine ou la complémentation alimentaire lors de carences minérales (Krishnamani et Mahaney, 2000 ; Aufreiter et al., 2001 ; Wilson, 2003). La consommation de sols semble également induire une sensation de satiété, ce qui explique son usage comme substitut alimentaire en période de famine, comme cela a été observé lors de périodes de pénurie alimentaire touchant les populations rurales du Mississippi (Vermeer et Frate, 1979 ; Klein et al., 2008). Encore très récemment, la famine qui a touché l'île de Haïti en 2008 a poussé les habitants à consommer régulièrement des galettes d'argile (nombreux reportages dans les journaux télévisés nationaux et internationaux).

1.2. Les effets associés à l'ingestion d'argile

La littérature attribue différentes causes à l'ingestion d'argile chez les singes comme chez l'Homme : la complémentation minérale, la protection de la muqueuse intestinale et le traitement des douleurs intestinales et de la diarrhée (Krishnamani et Mahaney, 2000 ; Dominy et al., 2004). Les Primates géophages ingèrent parfois des sols avec des compositions similaires en argiles pour rechercher des effets physiologiques différents (Knezevich, 1998). D'autres études suggèrent également que les argiles jouent un rôle dans la stimulation effective de la digestion (Castaing et Noblet, 1997, Tauquir et Nawaz, 2001).

A. La supplémentation minérale

Les terres ingérées peuvent être caractérisées par des concentrations différentes en une ou plusieurs espèces de minéraux, ainsi que par un contenu élevé en argile (Mahaney et Krishnamani, 2003 ; Wilson, 2003). La charge minérale apportée ainsi à l'organisme serait nécessaire au maintien d'une bonne santé pour certains Mammifères géophages. Les minéraux présents dans les sols ingérés peuvent combattre les effets négatifs d'un déficit minéral, et les argiles contenues dans ces sols peuvent diminuer l'influence de l'acidose et des composés secondaires des plantes ainsi que des infections intestinales (Wilson, 2003).

Des études cliniques ont montré que la consommation de terre peut à la fois traiter et induire des carences minérales et que les minéraux ingérés peuvent donc agir positivement ou négativement (Gomes et Silva, 2007). En effet, la géophagie peut provoquer une anémie par carence en fer, qui surviendrait après chélation des cations présents dans la lumière intestinale par les argiles ; ce mécanisme rendrait certains cations - le fer, le zinc, le potassium et le mercure - indisponibles et donc non absorbables (Halsted, 1968). C'est la raison pour laquelle la géophagie a souvent été considérée comme une pathologie. Avicenne, un médecin philosophe persan du X^{ème} siècle, avait pressenti cette corrélation en traitant les patients adeptes de géophagie avec du fer (Rainville, 1998). Plus récemment, une étude épidémiologique a montré que les femmes enceintes pratiquant la géophagie avaient une hémoglobinémie et une concentration en ferritine sérique inférieures à celles de femmes ne consommant pas d'argile (Geissler et al., 1998 b).

D'autres études, en revanche, soulignent le fait que l'ingestion d'argiles permettrait l'apport de nombreux éléments minéraux tels que le calcium, le sodium, le magnésium, le manganèse, le phosphore et le zinc (Hunter, 1973 ; Hunter et De Kleine, 1984 ; Abrahams, 1997). Cependant, dans de nombreux cas, les argiles sont ingérées sans qu'il existe nécessairement une relation stricte entre leur ingestion et leur minéralogie (Wilson, 2003). La géophagie n'a probablement pas qu'une seule fonction au sein d'une même zone d'ingestion. Les études à ce niveau montrent une grande variabilité dans les approches employées dans la caractérisation et l'analyse des sols, ce qui pose des problèmes dans l'interprétation des résultats.

B. La protection intestinale

La géophagie thérapeutique est issue de la rationalisation des pratiques instinctives de la géophagie ; elle a été définie à partir de l'observation des effets induits par l'ingestion de différentes argiles et a permis de définir leurs propriétés curatives et préventives (Gomes et Silva, 2007). Elle est classiquement associée à des situations de troubles intestinaux ou de stress.

1) Élimination des toxines contenues dans l'alimentation

La consommation d'argiles, et plus particulièrement de kaolinite, permet de protéger la muqueuse intestinale face à une ingestion d'éléments toxiques (Dominy et al., 2004). Les éléphants d'Asie (*Elephas maximus*) consomment préférentiellement une terre riche en kaolinite pour détoxifier la nourriture (Chandrajith et al., 2008). Le macaque rhésus (*Macaca mulatta*) consomme un sol riche en kaolinite pour lutter contre les endoparasites intestinaux (Knezevich, 1998). Chez l'être humain, l'ingestion d'argile par les populations d'Amérique du Sud permet de lutter contre les effets des alcaloïdes contenus dans la pomme de terre (Johns, 1986 ; Dominy et al., 2004). Il semble que la consommation d'argile pourrait permettre de lier ou de diluer les toxines dans l'appareil gastro-intestinal et de réduire leurs effets nuisibles sur l'organisme (Andrews et Horn, 2006).

L'ingestion d'argiles est aussi largement utilisée en médecine humaine et vétérinaire comme pansement gastrique et intestinal (Moré et al., 1987 ; Theodorou et al., 1994 ; Chang et al., 2007) ou pour ses effets anti-diarrhéiques (Luoba et al., 2005). La diarrhée peut être le symptôme d'intoxication ou d'infections bactériennes, virales ou parasitaires. L'effet anti-diarrhéique des argiles s'expliquerait en partie par leurs propriétés adsorbantes naturelles liées à leur structure en feuillets ; cet effet s'exerce soit directement par adsorption des bactéries ou des toxines libérées dans le tractus digestif (suite à la digestion de feuilles contenant des tannins ou des alcaloïdes par exemple), soit par l'absorption d'eau anormalement abondante dans la lumière intestinale (Knezevich, 1998 ; Krishnamani et Mahaney, 2000 ; Aufreiter et al., 2001 ; Haydel et al., 2008).

2) Nausée et vomissement

La nausée et le vomissement sont parmi les effets secondaires les plus sévères associés aux chimiothérapies (Cabezos et al., 2008). De nombreuses recherches actuelles ont pour but de comprendre les mécanismes associés à ces troubles. Malgré une physiologie digestive proche de la nôtre, le rat (*Rattus norvegicus*), principal animal de laboratoire utilisé, ne possède pas les réflexes lui permettant de vomir. Cependant, en cas de nausée, il a été observé que les rongeurs vont spontanément ingérer des morceaux de kaolinite présents dans leurs environnement (Mitchell et al., 1977). Cette ingestion de kaolinite définit le comportement de « *pica* » qui est employé comme indice de nausée (Mitchell et al., 1977 ; Takeda et al., 1993). Le « *pica* » augmente chez les animaux de laboratoire soumis à des injections de substances toxiques (McMahon et al., 1999 ; Yamamoto et al., 2004), de drogues anticancéreuses comme la cisplatine (Liu et al., 2005 ; Vera et al., 2006 ; Cabezos et al., 2008) ou à des irradiations (Yamamoto et al., 2002). A l'inverse, des drogues anti-nauséuses inhibent l'ingestion de kaolinite (Vera et al., 2006). La nausée induite chez les animaux conduit à la libération d'une hormone, la sérotonine, provenant des cellules entéro-chromaffines de l'intestin (Endo et al., 2002). Une forte activation des récepteurs à cette hormone augmenterait l'ingestion de kaolinite (Rudd et al., 2002). Des études récentes suggèrent que le « *pica* » utilise les mêmes voies nerveuses sensibles que les systèmes de la nausée (De Jonghe et Horn, 2008). Ainsi l'étude du comportement de « *pica* » procurerait une approche simple pour comprendre les mécanismes impliqués dans la nausée et trouver comment les traiter.

C. L'augmentation de l'efficacité alimentaire

Une des conclusions les plus répandues est que la géophagie aurait un effet bénéfique dans l'absorption gastro-intestinale (Dominy et al., 2004). Depuis plusieurs dizaines d'années, les éleveurs en production animale complètent l'alimentation avec quelques pourcents d'argiles afin d'augmenter l'efficacité des rations alimentaires (Trckova et al., 2004). Dans ce cas, la complémentation est imposée aux animaux.

Les effets de complémentations argileuses en nutrition animale sont décrits chez les poissons comme le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) qui ingère la montmorillonite ajoutée dans l'eau et cette ingestion accroît les capacités digestives des animaux (Abdel-Wahhab et al., 2005 ; Hu et al., 2007). Chez les oiseaux d'élevages, il a été montré que l'ajout de 2 à 5 % d'argile dans la ration de poules pondeuses (*Gallus domesticus*) augmente leur gain de poids, montrant par ceci une amélioration du rendement calorique de l'alimentation (Quisenberry, 1968). Chez ces animaux, l'ajout d'argile imposé dans la ration alimentaire entraîne des effets perceptibles sur l'efficacité alimentaire, avec notamment une diminution du gain de masse corporelle (Southern et al., 1994; Carré, 2000 ; Tauquir et Nawaz, 2001 ; Trckova et al., 2004).

De même, des porcs (*Sus scrofa domesticus*) complémentés avec 2 % de sépiolite (argile à structure fibreuse) présentent une croissance musculaire légèrement augmentée et donc une teneur en muscle dans la carcasse plus élevée (Castaing et Noblet, 1997). La complémentation avec des argiles, spécialement de la bentonite, faciliterait l'assimilation en diminuant le flux de la digestion (Castaing et Noblet, 1997; Tauquir et Nawaz, 2001). Pour les agneaux (*Ovis aries*) et les bouvillons (*Bos taurus*), l'ajout de 2,5 à 7,5 % de micas magnésiens dans la ration améliore les capacités alimentaires (Coffey et al., 2000). Les agneaux complémentés en bentonite à hauteur de 4 à 6 % nécessitent moins de nourriture pour atteindre le même gain de poids (Huttington et al., 1977a, b). En laboratoire, une complémentation en kaolinite sur une grande période de temps a par exemple des effets variés sur le métabolisme du rat (Trckova et al., 2004). L'ajout de 10 % de poudre de kaolinite à la nourriture pendant 14 jours induit chez le rat Wistar une augmentation de la masse corporelle ainsi que celle de la masse du foie, du cœur et du côlon (Sakata, 1986). Enfin des travaux récents réalisés dans notre équipe au laboratoire ont montré que la présence de kaolinite dans la lumière intestinale augmentait l'absorption lipidique (Habold et al., sous presse).

En conclusion, au vu de l'ensemble des données bibliographiques traitant des effets associés à l'ingestion d'argile, il nous a semblé intéressant de chercher à comprendre le devenir et l'impact des particules d'argiles au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle, après une ingestion volontaire de kaolinite ou de montmorillonite.

2. ARGILES ET MINÉRAUX ARGILEUX

Les roches argileuses et les minéraux argileux qui les composent, sont des matériaux bien connus, omniprésents à la surface de la Terre et essentiellement alumino-silicatés. Leurs propriétés physico-chimiques bien spécifiques, reconnues par l'Homme depuis la Haute Antiquité, sont largement utilisées depuis des milliers d'années dans de nombreux domaines avec des applications multiples : industrie des céramiques et des colorants, biologie, médecine, esthétique, pharmacologie, bâtiment, agriculture, ... En préambule de nos travaux, il est utile de faire quelques rappels sur la définition et la classification de ces matériaux et aussi sur leurs propriétés et comportements.

2.1. Définition et nomenclature

A. Présentation générale

Le terme « argile » est complexe car il a plusieurs sens selon l'échelle ou la discipline considérée (voir la revue de Caillère et al., 1982). Dans le langage courant et au sens large, les argiles sont des roches ou terres constituées par l'association de plusieurs espèces minérales, où les minéraux argileux prédominent. Au sens strict, les argiles représentent un ensemble de minéraux de très petite taille appartenant à une espèce bien définie offrant des propriétés particulières de gonflement et de plasticité. La définition adoptée par les géologues s'appuie sur les spécificités chimiques et physiques. Les argiles, au sens large, représentent l'ensemble des minéraux de la fraction granulométrique inférieure à 2 microns, sans spécificité minéralogique particulière et peuvent comprendre de nombreuses sortes de minéraux (quartz, feldspaths, carbonates, micas, etc.). Les argiles, au sens strict, sont des minéraux argileux vrais, c'est-à-dire des minéraux appartenant uniquement à la classe des phyllosilicates et caractérisés par un réseau cristallin en feuillets. Dans ce travail, nous avons utilisé « argile » d'une part au sens large en y englobant l'ensemble des particules fines du sol, également appelé « terre », notamment dans l'approche bibliographique de la géophagie dans la nature, et d'autre part au sens strict, lors de l'utilisation des minéraux argileux pour l'expérimentation en laboratoire

Aujourd'hui, du point de vue textural et cristallographique, les minéraux argileux sont de mieux en mieux connus. Ce sont des matériaux très réactifs et sensibles à leur environnement, utilisés comme marqueurs, traceurs ou acteurs de l'évolution de nombreux systèmes naturels ou expérimentaux (voir références dans Clauer et Chaudhuri, 1995 et Bergaya et al., 2006). C'est la diffraction X qui est à l'origine de l'intérêt croissant pour l'étude de ces minuscules particules considérées jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle comme essentiellement amorphes. Les "qualités" intrinsèques des minéraux argileux, qui en font un matériau particulier à applications multiples, sont en fait basées sur plusieurs propriétés caractéristiques : une très petite taille d'où des surfaces spécifiques très importantes et d'excellentes qualités d'adsorption ; une structure lamellaire, en feuillets parallèles, d'où des propriétés rhéologiques spécifiques ; une forte affinité pour les molécules d'eau associée à un fort potentiel gonflant, et une grande capacité à échanger des éléments chimiques avec leur environnement, ce qui donne des qualités d'absorption. Ces capacités varient évidemment selon les types d'argiles. Des études minéralogiques intégrées, structurales et cristallographiques (par diffraction des rayons X, spectroscopie IR -Infra Rouge, spectroscopie EXAFS -Extended X-Ray Absorption Fine Structure, ATD -analyse thermique différentielle, microscopie électronique, etc) et géochimiques (par spectrométrie ICP, fluorescence X, géochimie isotopique, CEC -capacité d'échange cationique, etc) permettent de différencier les familles ou groupes de minéraux argileux entre eux et d'évaluer leurs caractéristiques.

B. Classification

Les minéraux argileux sont des aluminosilicates plus ou moins fortement hydratés appartenant au groupe des phyllosilicates (voir la revue de Bailey, 1980). Ils sont caractérisés par une structure en feuillets, et chaque feuillet est lui-même constitué par différentes couches de type tétraédrique (silicatée) ou octaédrique (alumineuse). L'unité de base des phyllosilicates est le tétraèdre (SiO_4) où l'ion silicium Si^{4+} est situé au centre d'un tétraèdre dont les extrémités sont des ions O^{2-} . L'ion aluminium Al^{3+} peut remplacer Si^{4+} dans le tétraèdre mais généralement il est hexacoordonné et situé au centre d'un octaèdre (AlO_6). Les couches octaédriques peuvent être di- ou trioctaédriques : si les six valences négatives du site octaédrique sont compensées par trois cations bivalents (Mg^{2+} principalement, Fe^{2+} plus rarement), la couche est trioctaédrique, tandis qu'avec deux cations trivalents (Fe^{3+} ou Al^{3+}), la couche est dioctaédrique.

La structure de l'argile est, en quelque sorte, équivalente au code génétique des espèces biologiques (Figures 5 et 6). Selon la nature (structure, organisation et composition) des feuillets, la charge interfoliaire et la composition des éléments interfoliaires, les minéraux argileux sont classés en différentes espèces, ayant chacune différentes caractéristiques et propriétés (Brindley et Brown, 1984).

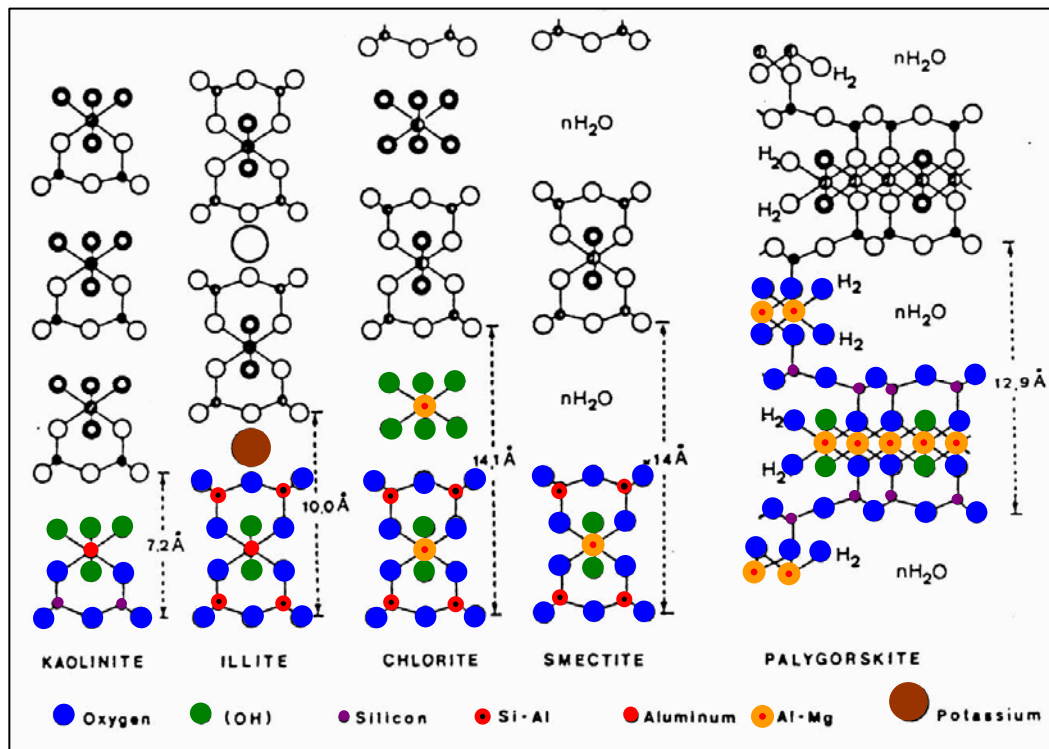


Figure 5. Schéma général de la structure des grands groupes de minéraux argileux. (D'après Millot, 1964, modifié)

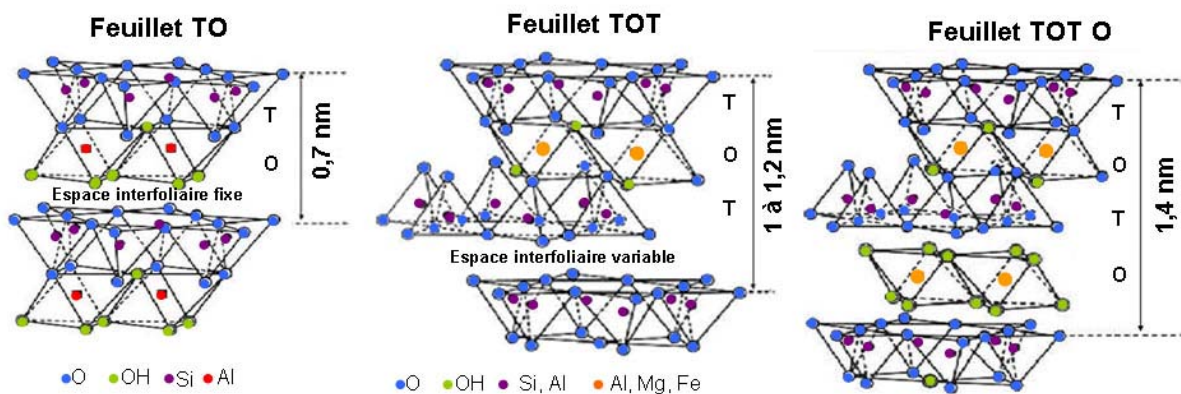


Figure 6 : Représentation schématique des structures en feuillets des argiles. (D'après Rautureau et al., 2004, modifié)

Les principaux critères de classification sont basés sur : (1) la structure et la combinaison des couches ; (2) le type de cations octaédriques ; (3) la charge de la couche interfoliaire; (4) la nature des éléments dans l'espace interfoliaire (cations, molécules d'eau). Des critères additionnels peuvent aussi être considérés comme : (5) le polytypisme (ou mode d'empilement), (6) la composition chimique, (7) le type de couches et la nature des empilements dans les familles interstratifiées régulières ou désordonnées.

Trois grands types d'argile sont distingués selon : le nombre de couches octaédriques et tétraédriques dans le feuillet unité, la distance (d_{001}) entre deux feuillets de base en conditions normales, et la variabilité de la distance (d_{001}) après divers traitements (Figure 6).

Les minéraux de type 1:1 (ou T-O) dont le feuillet comprend une couche tétraédrique et une couche octaédrique, correspondent au groupe de la kaolinite. Si l'espace interfoliaire est vide, cas de la kaolinite par exemple, $d_{001} = 0,71$ nm; avec de l'eau dans l'espace interfoliaire, cas de l'halloysite, $d_{001} = 1,01$ nm.

Les minéraux de type 2:1 (ou T-O-T) dont le feuillet comprend une couche octaédrique entre deux couches tétraédriques, correspondent aux groupes des smectites, vermiculites et illites ; d_{001} varie de 0,93 à 1,5 nm. Si l'espace interfoliaire est vide, cas de la pyrophyllite par exemple, $d_{001} = 0,93$ nm ; s'il contient des cations (de type K, Na, Ca, etc), cas de l'illite, $d_{001} = 1$ nm; et avec des cations très hydratés, cas des vermiculites et smectites, $d_{001} = 1,5$ nm.

Les minéraux de type 2:1:1 (ou T-O-T-O) dont le feuillet comprend une couche octaédrique entre deux couches tétraédriques et dont l'espace interfoliaire est rempli par une couche octaédrique, correspondent au groupe des chlorites ; $d_{001} =$ environ 1,4 nm.

Un exemple de classification générale des minéraux argileux est présenté dans le tableau 0-1. Les argiles les plus abondantes dans les environnements de surface sont les kaolinites, illites, smectites et chlorites, ainsi que les familles d'interstratifiés illite-smectite (I-S), smectite-chlorite (S-C) et kaol-illite (K-I).

Classification of Phyllosilicates Related to Clay Minerals

Layer Type	Interlayer Material	Group	Subgroup	Species (Examples)
1:1	None or H ₂ O only	Serpentine-kaolin (x=0)	Serpentine Kaolin	Chrysotile, lizardite, berthierine, Kaolinite, dickite, nacrite, halloysite
2:1	None	Talc-pyrophyllite (x=0)	Talc Pyrophyllite	Talc, willeseite Pyrophyllite
	Hydrated exchangeable cations	Smectite (x ~ 0.2-0.6)	Saponite Montmorillonite	Saponite, hectorite, sauconite, stevensite, etc. Montmorillonite, beidellite, nontronite
	Hydrated exchangeable cations	Vermiculite (x ~ 0.6-0.9)	Trioctahedral vermiculite Diocahedral vermiculite	Trioctahedral vermiculite Diocahedral vermiculite
	Nonhydrated cations	True mica (x ~ 0.5-1.0)	Trioctahedral true mica Diocahedral true mica	Phlogopite, biotite, lepidolite, annite Muscovite, illite, glauconite, paragonite, celadonite
	Nonhydrated cations	Brittle mica (x ~ 2.0)	Trioctahedral brittle mica Diocahedral brittle mica	Clintonite Margarite
	Hydroxide	Chlorite (x variable)	Trioctahedral chlorite Diocahedral chlorite	Clinochlore, chamosite, nimits, pennantite Donbassite
2:1 mixed-layer (regular)	Variable	None	None	Hydrobiotite, rectorite, corrensite, aliettite, tosudite, kulkeite
Modulated 1:1 layer	None	No group name (x ~ 0)	No subgroup name	Antigorite, greenalite
Modulated 2:1 layer	Hydrated exchangeable cations	Sepiolite-palygorskite (x ~ variable)	Sepiolite Palygorskite	Sepiolite, loughlinite Palygorskite
	Variable	No group name (x-variable)	No subgroup name	Minnesotaite, stilpnomelane, zussmanite

x = Layer charge/O₁₀ (OH)₂

(Brindley and Brown 1980; S. W. Bailey, Pers. Comm., 1987)

Tableau O- 1. Classification des phyllosilicates recommandée par l'AIPEA

Type d'empilement	Épaisseur des feuillets	Substitution dans la couche tétraédrique et valeur de la substitution		Substitutions dans la couche octaédrique	Nom du minéral	Cations inter-foliaires	CEC milli-équivalents par gramme	Eau inter-foliaire	Distance inter-foliaire
Te/Oc	7 Å	non	-	non	kaolinite	non	<0,1	non	7 Å
Te/Oc/Te	10 Å	non	-	oui	montmorillonite	oui, divers	1-1,2	oui	variable
		Al ³⁺	0,5	non	beidellite	oui, divers	1-1,2	oui	variable
		Al ³⁺	0 < x < 1	oui	illite	K ⁺	0,2-0,3	non	10 Å
		Al ³⁺	1	oui	vermiculite	divers	1-1,5	oui	variable
		Al ³⁺	>1	oui	chlorite	Mg ²⁺ , Al ³⁺	0,1-0,15	non	14 Å

Tableau O- 2. Principaux minéraux argileux des sols (Stengel et Gelin, 1998)

C. Réactivité

La petite taille de certains minéraux argileux et les particularités de leur structure expliquent leur forte réactivité liée à une surface spécifique élevée et à une capacité variable à échanger de nombreux cations et anions, présents dans le réseau cristallin ou adsorbés à la surface. Les nombreuses interactions eau-argile varient avec les propriétés de l'espèce argileuse considérée et avec les paramètres du milieu environnant : composition chimique, concentrations, température, pH, etc.

La capacité d'échange cationique (ou CEC) est le nombre de charges positives compensant la charge superficielle; elle est généralement exprimée en milliéquivalents pour 100g d'argile calcinée. Elle varie avec l'espèce considérée (tableau 0-2). Le pouvoir absorbant est également très variable. Pour les argiles gonflantes comme les smectites, les cations ont une forte tendance à s'hydrater, forçant l'espace interfoliaire à s'agrandir. Cette capacité à fixer, dans l'espace interfoliaire, des molécules variables en taille, permet de piéger des espèces chimiques en solution, y compris les toxines organiques.

2.2. Argiles utilisées

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les effets des minéraux argileux sont multiples : ils sont **souvent bénéfiques** mais peuvent être **néfastes** dans certains cas. Ils s'expliquent par des propriétés rhéologiques, surtout mucoprotectrices, ou par des propriétés plus complexes d'adsorption et d'absorption. Afin de rester dans un domaine minéralogique proche du cadre de la géophagie, les argiles sélectionnées pour initier le travail ne sont pas des phases purifiées mais des argiles naturelles commercialisées. Pour visualiser comment ces différents types d'argiles interagissent avec le milieu vivant, nous nous sommes fixés comme objectif d'essayer de mieux comprendre les mécanismes de l'interaction argile-muqueuse en utilisant notamment la microscopie électronique à balayage en mode environnemental (ESEM), au delà des méthodes plus classiques (RX, chimie, MEB, MET).

A. La kaolinite

Cette argile a une répartition universelle dans les sols (Figure 7).

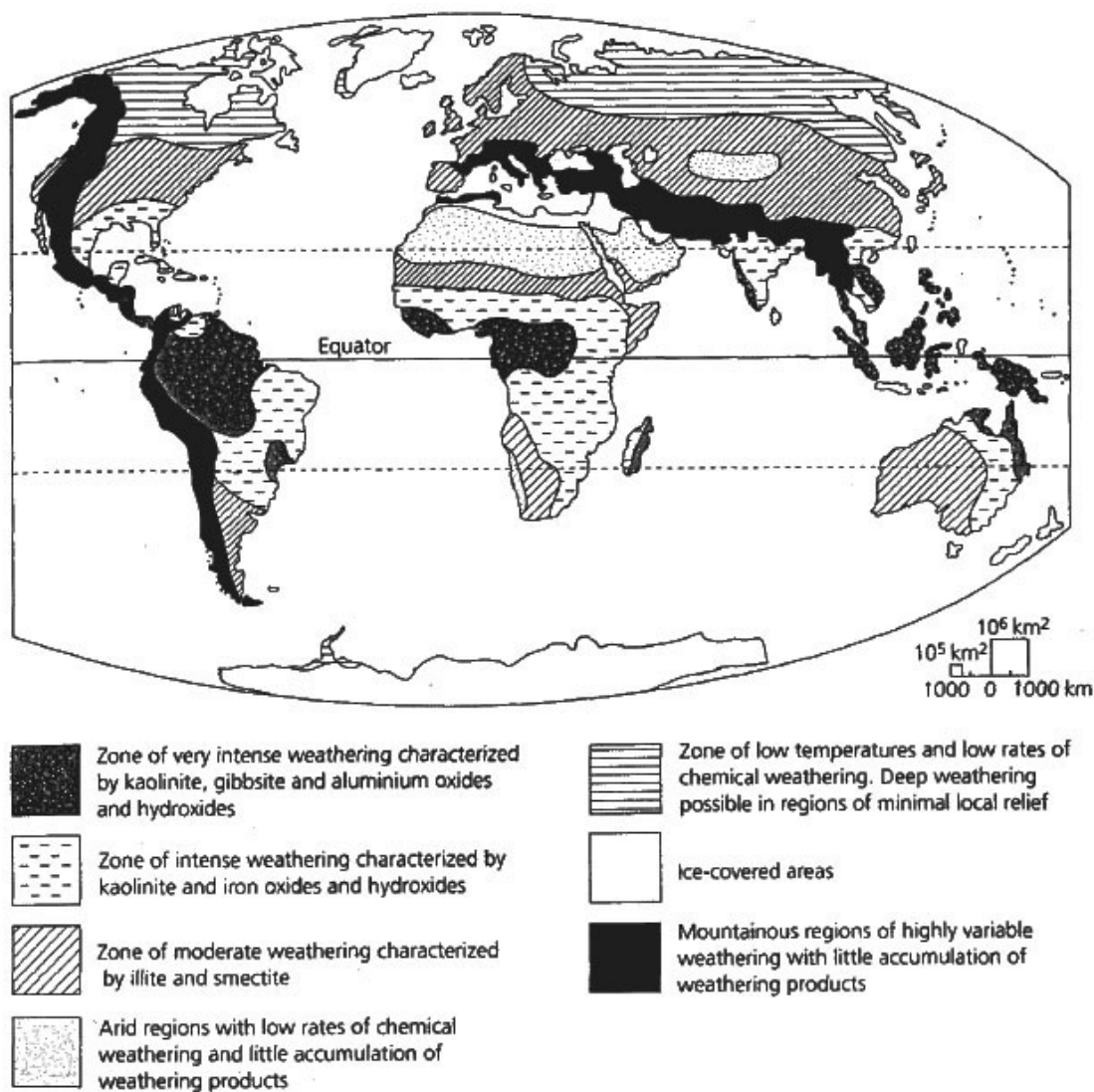


Figure 7. Répartitions terrestres des argiles. Hydrolyse et zonation climatique.
(D'après Allen, 1997, voir site internet Fagel 2008)

Sa formule idéale est $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ou $\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$, suivant que l'on considère une $\frac{1}{2}$ maille ou une maille entière. C'est l'un des minéraux argileux les plus simples, avec une structure de type 1:1 où l'aluminium (Al^{3+}) et le silicium (Si^{4+}) sont les cations structuraux de base (Figure 8). Des informations plus détaillées ainsi que de nombreuses références sont

présentées dans Bergaya et al. (2006). Quelques données chimiques et structurales sont présentées dans le tableau 0-1 et la figure 8.

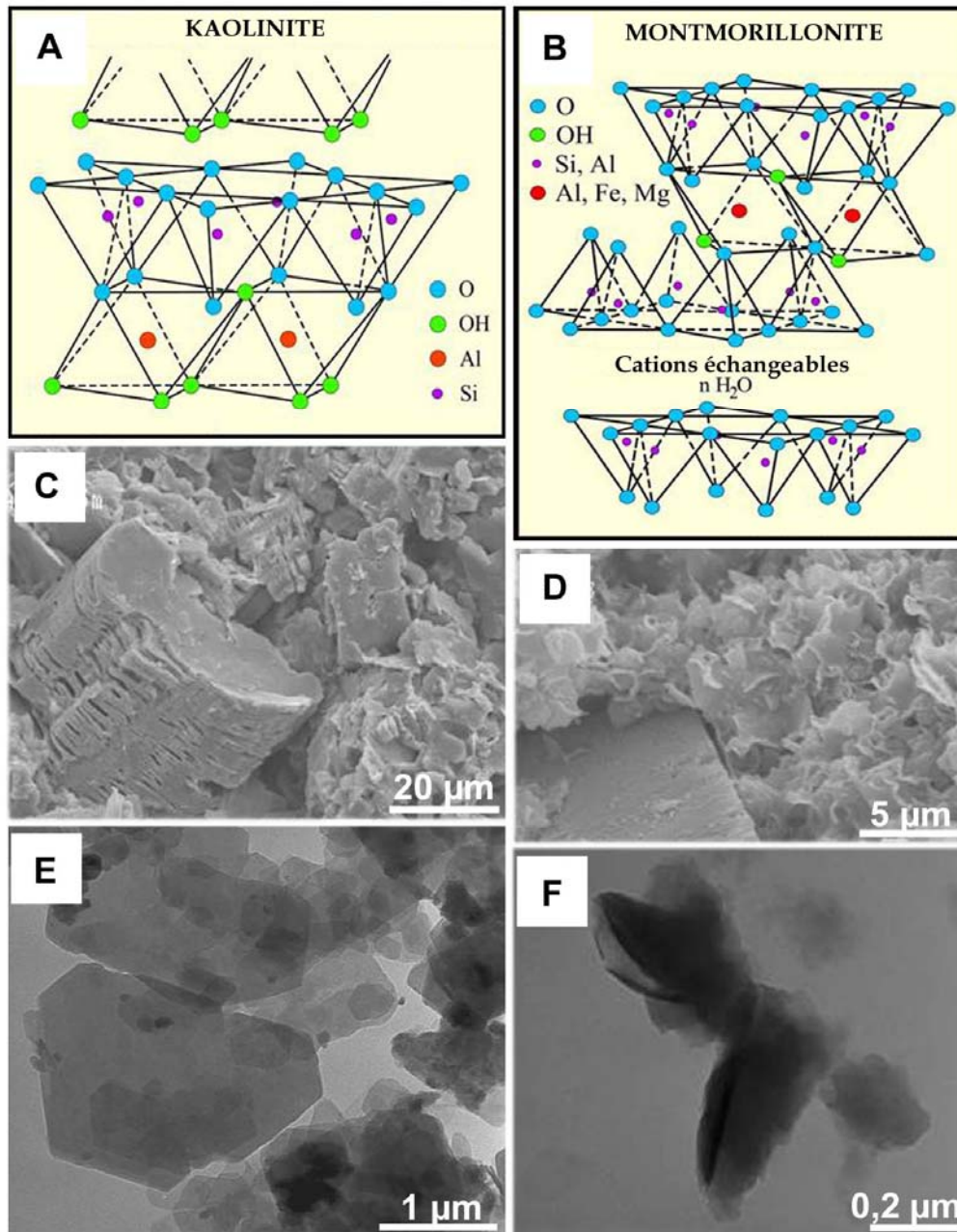


Figure 8. Caractéristiques de la kaolinite et de la montmorillonite.

(A) Schéma représentant la structure de la kaolinite (d'après Grim, 1962). (B) Schéma représentant la structure de la montmorillonite (d'après Grim, 1962). (C) Image CSEM de particules de kaolinite dans un sol. (D) Images CSEM de particules de montmorillonite dans une argilite. (E) Image MET de plaquettes hexagonales rigides de kaolinite. (F) Image MET de lamelles de montmorillonite.

Abondante dans de nombreux sols, la kaolinite est une argile souvent ingérée dans la nature, mais également utilisée depuis longtemps dans la pharmacologie. Comme nous l'avons vu, l'ingestion de kaolinite est associée à de nombreux effets : elle réduit la

biodisponibilité des alcaloïdes et des tannins (Dominy et al., 2004), est utilisée pour traiter la diarrhée et les troubles intestinaux (Wilson, 2003), et comme index d'un état de malaise chez les rongeurs dans la mise au point de médicaments antécancéreux (Cabezos et al., 2008).

Durant cette étude, la kaolinite a été la principale argile utilisée, en raison de sa composition chimique simple et du nombre d'études décrivant la consommation de kaolinite par de nombreux animaux.

Tableau 0- 3. Composition chimique de la kaolinite et de la montmorillonite.

<u>Kaolinite</u>				<u>Montmorillonite</u>					
Formule générale :	$Al_2Si_2O_5(OH)_4$			Formule générale :	$(Na,Ca)_{0,3}(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot n(H_2O)$				
Masse moléculaire :	258,16 g.mol ⁻¹			Masse moléculaire :	549,07 g.mol ⁻¹				
Composition : (% massique)	Eléments :		Oxydes :	Composition : (% massique)	Eléments :		Oxydes :		
Aluminium	Al	20,90 %	Al ₂ O ₃	39,50 %	Sodium	Na	0,84 %	Na ₂ O	1,13 %
Silicium	Si	21,76 %	SiO ₂	46,55 %	Calcium	Ca	0,73 %	CaO	1,02 %
Hydrogène	H	1,56 %	H ₂ O	13,96 %	Aluminium	Al	9,83 %	Al ₂ O ₃	18,57 %
Oxygène	O	55,78 %			Silicium	Si	20,46 %	SiO ₂	43,77 %
					Hydrogène	H	4,04 %	H ₂ O	36,09 %
		100,00 %		100,01%	Oxygène	O	64,10 %		
							<u>100,00 %</u>		<u>100,58%</u>

B. La montmorillonite

La montmorillonite appartient au groupe des smectites dont la répartition est tout autant généralisée que celle de la kaolinite (Figure 7). Sa formule générale théorique est $(Na, Ca)_{0,3}(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$. C'est une argile de type TOT gonflante dont le contenu interfoliaire est facilement échangeable (Tableau 0-3, Figure 8). Son nom vient de la localité de Montmorillon, dans la Vienne. Elle est connue sous l'appellation de *terre de Sommière*.

La montmorillonite est souvent associée à des gisements de bentonite, dont le nom vient de Fort Benton aux Etats-Unis. Le terme, représentant des argiles d'origines volcaniques riches en montmorillonite, peut englober des matériaux de compositions différentes. Ainsi, il existe des bentonites qui sont riches en sodium, d'autres en calcium, potassium ou

magnésium. Dans l'eau, la bentonite gonfle de 10 à 15 fois son volume original et absorbe 6,5 fois son poids en eau. La bentonite possède diverses propriétés, celles notamment d'absorber les protéines et de réduire l'activité de certaines enzymes (Yeşiloğlu, 2005).

Comme pour la kaolinite, l'ingestion de montmorillonite s'accompagne de nombreux effets : les animaux qui la consomment montrent une augmentation de la croissance associée à une réduction de la colonisation bactérienne de l'intestin (Tauquir et Nawaz, 2001). Elle agit comme un protecteur de la muqueuse intestinale (Droy-Lefaix et al, 1985 ; Kawase et al, 2004) et peut fixer les pathogènes entériques sélectivement afin de les excréter. Elle renforce la barrière de la muqueuse intestinale et aide à la régénération de l'épithélium (Girardeau, 1987). La montmorillonite est également utilisée pour ses effets antidiarrhéiques en médecine humaine et vétérinaire (Petkova et al, 1981 ; Dembinski et al, 1985 ; Xia et al, 2004).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le lien entre métabolisme – nutrition – tractus gastro-intestinal - argiles est connu depuis bien longtemps. Pourtant, les raisons pouvant expliquer la généralisation et la persistance de la géophagie au cours du temps et pour des espèces si variées, sont encore mal comprises et restent parfois controversées. Pour mieux comprendre les avantages et désavantages liés à l'ingestion d'argiles, il semblait important d'étudier plus en détail la manière dont les argiles interagissent avec l'intestin, organe responsable de l'absorption des nutriments au niveau de sa muqueuse et doué de grandes capacités d'adaptation.

3. LA PHYSIOLOGIE DE L'ABSORPTION INTESTINALE

La digestion englobe l'ensemble des processus mécaniques et biochimiques par lesquels les aliments ingérés sont transformés en substances nutritives susceptibles d'être assimilées (voir revue de Vander et al., 1995). Après avoir subi l'action de la mastication et des enzymes salivaires, le bol alimentaire parvient dans l'estomac où les nutriments subissent des modifications permettant leur absorption ultérieure éventuelle. Puis la digestion se poursuit dans l'intestin grêle sous l'action des enzymes digestives, par la transformation des glucides en glucose, des lipides en acides gras et en monoglycérides et des protéines en acides aminés. L'intestin grêle absorbe ces nutriments, véhiculés ensuite dans les circulations sanguine et lymphatique.

L'intestin grêle constitue donc une interface entre le milieu extérieur et intérieur. Cette barrière physique assure la phase ultime de dégradation des aliments ingérés, l'absorption des produits de la digestion ainsi que la progression du bol alimentaire par son activité motrice (voir Richard et al., 1997).

3.1. Les structures de l'intestin grêle

A. Anatomie

L'intestin grêle est, chez les Mammifères, un organe cylindrique long situé dans l'abdomen et s'étendant du pylore à la jonction iléo-cæcale (voir Grignon, 1996). Il est constitué de trois parties distinctes (Figure 9): (1) le duodénum, segment initial court, (2) le jéjunum, où a lieu la majorité de l'absorption des nutriments, et (3) l'iléon, longue portion mobile repliée en de nombreuses anses intestinales dans la cavité abdominale. Les transitions anatomiques entre ces trois portions sont progressives.

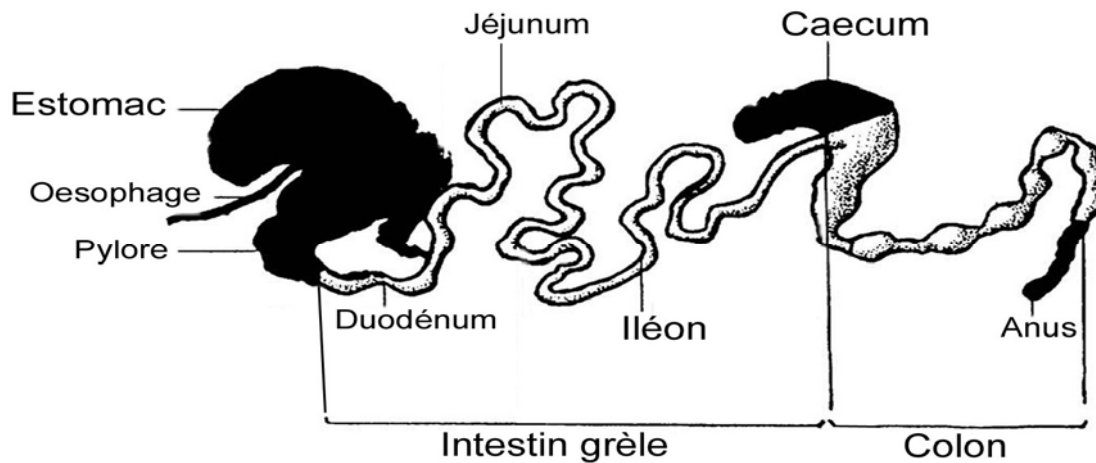


Figure 9. Schéma représentant le tube digestif chez le rat.
En blanc l'ensemble intestin grêle - gros intestin (côlon).

1) Le duodénum

Le duodénum est la première portion de l'intestin grêle. Le canal cholédoque, venant de la vésicule biliaire, et le canal de Wirsung, issu du pancréas, débouchent dans le duodénum. Ces deux canaux, déversant respectivement la bile et les enzymes pancréatiques, ont souvent un orifice duodéal commun, l'ampoule de Vater. Le duodénum histologique est plus court que le duodénum anatomique, s'arrêtant au niveau de l'ampoule de Vater. La muqueuse duodénale est pourvue de villosités plus lamellaires que cylindriques.

Le duodénum reçoit le **chyme gastrique** (substance semi-liquide, épaisse et visqueuse produite au niveau de l'estomac lors de la digestion de la nourriture), imprégné des enzymes salivaires et gastriques. Dans cet organe, le chyme subit l'action du suc pancréatique, de la bile et du suc intestinal. Les aliments sont dégradés en nutriments ou métabolites pouvant franchir la barrière intestinale. Les résidus non digérés restent dans la lumière intestinale et sont évacués dans le côlon où ils constituent les fèces.

2) Le jéjunum et l'iléon

La plupart des phénomènes digestifs sont réalisés dans le duodénum, les autres segments participent principalement à l'absorption des nutriments et des ions. Le **jéjunum** fait suite au duodénum et possède une paroi interne constituée d'une muqueuse tapissée de nombreux replis qui augmentent la surface totale interne et permettent une plus grande absorption des

lipides, des glucides et des protéines. Il n'est vascularisé que par l'artère mésentérique supérieure. Sa longueur représente environ un sixième de celle de l'intestin grêle chez le rat. Il commence à partir de l'ampoule de Vater avec l'apparition des premières valvules conniventes, et se termine avec l'iléon. Le pH de la lumière jéjunale est en général neutre ou légèrement alcalin. L'**iléon** est la partie finale de l'intestin grêle. Il s'étend du jéjunum à la valvule iléo-caecale et se termine au niveau du côlon par un carrefour appelé cæcum. Il assure l'absorption de certains micronutriments, d'électrolytes et de vitamines. Le pH de la lumière iléale est aussi neutre ou légèrement alcalin.

B. L'épithélium intestinal

L'intestin grêle, caractérisé par une **importante surface d'échange** au niveau de la muqueuse, est le principal organe de l'absorption. Sa surface résulte d'une part de la longueur de l'intestin, et d'autre part de l'organisation même de la muqueuse.

La surface de l'intestin est augmentée par la présence des replis circulaires macroscopiques et des valvules conniventes, ou valvules de Kerckring. Ces valvules résultent de soulèvements de la muqueuse causés par des épaisissements de la sous-muqueuse, qui multiplient la surface d'échange par trois. Ces valvules sont très développées dans le duodénum et l'iléon. La surface de l'intestin est également augmentée par l'existence de villosités intestinales au niveau de la muqueuse (Figure 10A). Ces digitations, qui se projettent à environ 1 mm de la muqueuse, résultent de soulèvement du chorion multipliant de nouveau cette surface par vingt (Figure 10B).

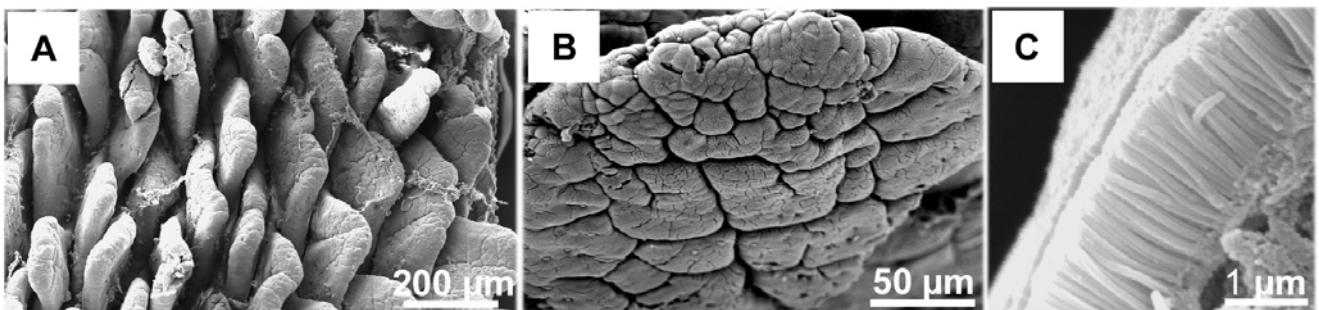


Figure 10. Villosités et microvillosités de rat.
(A et B) Villosités intestinales (CSEM). (C) Microvillosités vues le long d'une cassure de la muqueuse intestinale (CSEM).

Les villosités sont formées par des cellules absorbantes, les entérocytes (décrites un peu plus loin), qui possèdent au niveau apical une bordure en brosse composée de microvillosités (voir Keele et al, 1982) (Figure 10C). Ces digitations microscopiques, d'une longueur comprise entre 1 et 2 μm , résultent du plissement de la membrane apicale des entérocytes et multiplient au final la surface d'absorption par dix (Mayhew et Middleton, 1985). Ces différents replis font que la surface de l'intestin est multipliée par environ 600.

1) Structure

Tout au long du tube digestif, la paroi de l'intestin comporte quatre couches concentriques qui sont, de la lumière vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Figure 11) (Keele et al, 1982).

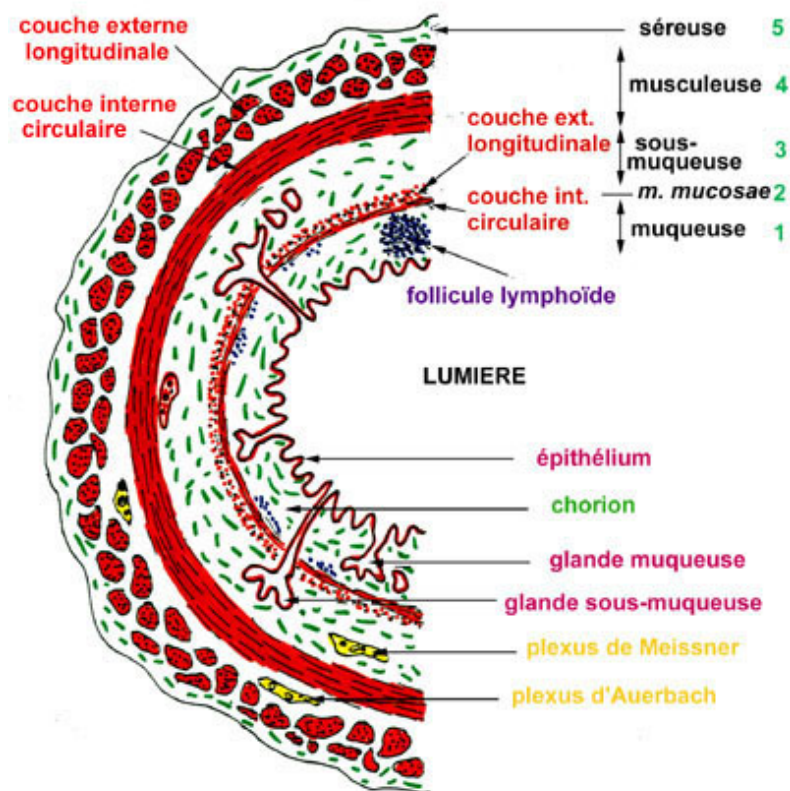


Figure 11. Schéma représentant la disposition interne de l'intestin en vue transversale. (N. Vacheret, UCB Lyon, site internet consulté en 2008)

La **muqueuse** est délimitée par un épithélium reposant sur une structure appelée *lamina propria* qui entoure le chorion au centre des villosités intestinales. Le chorion est formé de

fibres collagènes et élastiques, de vaisseaux et de nerfs destinés à assurer la nutrition de l'épithélium. Cette couche conjonctive profonde qui se trouve sous l'épithélium est riche en cellules immunitaires. Celles-ci sont organisées en formations lymphoïdes et en glandes exocrines dont la structure, l'importance et la disposition varient selon les segments. Son épithélium est simple, composé de cellules prismatiques à plateau strié appelées entérocytes, de cellules caliciformes et de cellules endocrines notamment ; il agit comme une barrière limitant les apports de matériaux toxiques et d'antigènes (Yang et al., 2001). La muqueuse contient les villosités et les cryptes intestinales. Les cryptes sont des replis invaginés dans le chorion entre les villosités contenant les glandes de Lieberkühn. Les villosités du jéjunum sont longues et fines ; celles de l'iléon sont plus larges, plus courtes et moins nombreuses. La muqueuse de l'iléon est en plus caractérisée par un nombre élevé de cellules caliciformes et de cryptes. Pour finir, la muqueuse et le chorion reposent sur une couche musculaire fine appelée *muscularis mucosae*.

La **sous-muqueuse** est composée d'un tissu conjonctif plus dense contenant des vaisseaux sanguins et un réseau de neurones intramuraux, le plexus de Meissner, qui, entre autres fonctions, commande la motricité du tube digestif. C'est dans cette couche que se trouvent les follicules lymphoïdes annexés au tube digestif, tels que les plaques de Peyer au niveau de l'iléon, ainsi que les glandes du duodénum. En effet, la sous-muqueuse duodénale contient la partie acineuse des glandes de Brunner. Ce sont des glandes tubulo-acineuses composées de nombreux acinus de type muqueux, dont les canaux excréteurs traversent la *muscularis mucosae* et s'abouchent dans la lumière de l'intestin. Leur produit de sécrétion est une mucine alcaline qui protège la muqueuse duodénale de l'acidité gastrique et élève le pH du contenu intestinal à une valeur optimale pour l'action des enzymes pancréatiques. De plus, la sous-muqueuse se soulève en valvules conniventes dans le jéjunum et l'iléon, entraînant avec elle la *muscularis mucosae* et la muqueuse alors que la musculature et la séreuse ne s'incurvent pas localement.

La **musculature** comprend généralement deux plans de muscles lisses: un plan interne et épais, de fibres circulaires, et un plan externe de fibres longitudinales. Entre les deux se retrouve un autre type de plexus nerveux, plus important que le précédent, le plexus myentérique ou d'Auerbach. La composante musculaire externe produit les mouvements péristaltiques qui permettent la progression des aliments le long du tube digestif. La composante circulaire de la musculature est renforcée et constitue un sphincter à la fin de l'iléon, au niveau de la valvule iléo-caecale ou valvule de Bauhin.

Enfin, la **séreuse** est une couche de tissu conjonctif dense vascularisée et comportant de nombreux adipocytes. Cette couche se termine par un mésothélium qui est le feuillet viscéral du péritoine.

Tout au long de l'intestin grêle, la muqueuse est formée de trois types de structures qui sont, de la lumière du tube vers la *muscularis mucosae* : 1) les villosités, 2) les cryptes intestinales et 3) les organes lymphoïdes qui présentent une concentration élevée de lymphocytes.

2) Les cryptes intestinales

Les cryptes sont des replis invaginés dans le chorion entre les villosités (Figure 12A et 12D).

Ce sont des structures hautement hiérarchisées qui comprennent des cellules souches ainsi qu'une population intermédiaire de cellules déterminées, en croissance rapide et en voie de différenciation. Elles contiennent les glandes de Lieberkühn qui sont des glandes tubuleuses simples droites, serrées dans la partie profonde du chorion, et qui s'ouvrent dans la lumière intestinale entre les villosités (Figure 12A). Au fond de ces glandes se réalisent des amitoses (Cairnie et al., 1965). Les cellules indifférenciées du fond des cryptes deviennent matures au fur et à mesure de leur migration vers le sommet des villosités, et assurent le renouvellement de l'épithélium tous les deux ou trois jours chez le rat adulte (Cairnie et al., 1965). En plus des cellules non différenciées en migration, l'épithélium glandulaire comporte des cellules caliciformes synthétisant du mucus, des cellules de Kulchitzky capables de sécrétion endocrine ainsi qu'au fond des glandes des cellules pyramidales dites de Paneth, riches en grains de sécrétion contenant du lysozyme, enzyme antibactérienne (Figure 12D).

3) Les villosités

Les villosités sont des replis de la muqueuse et du tissu conjonctif sous-jacent de l'intestin grêle permettant l'amplification des processus d'absorption par augmentation de la surface intestinale. L'épithélium prismatique simple, ou monostratifié, qui recouvre les villosités, est essentiellement constitué de cellules cylindriques munies d'un plateau strié, les **entérocytes** (Figure 12C et 12D), entre lesquelles sont présentes quelques cellules caliciformes (Figure 12D) (voir la revue de Cross et Mercer, 1993).

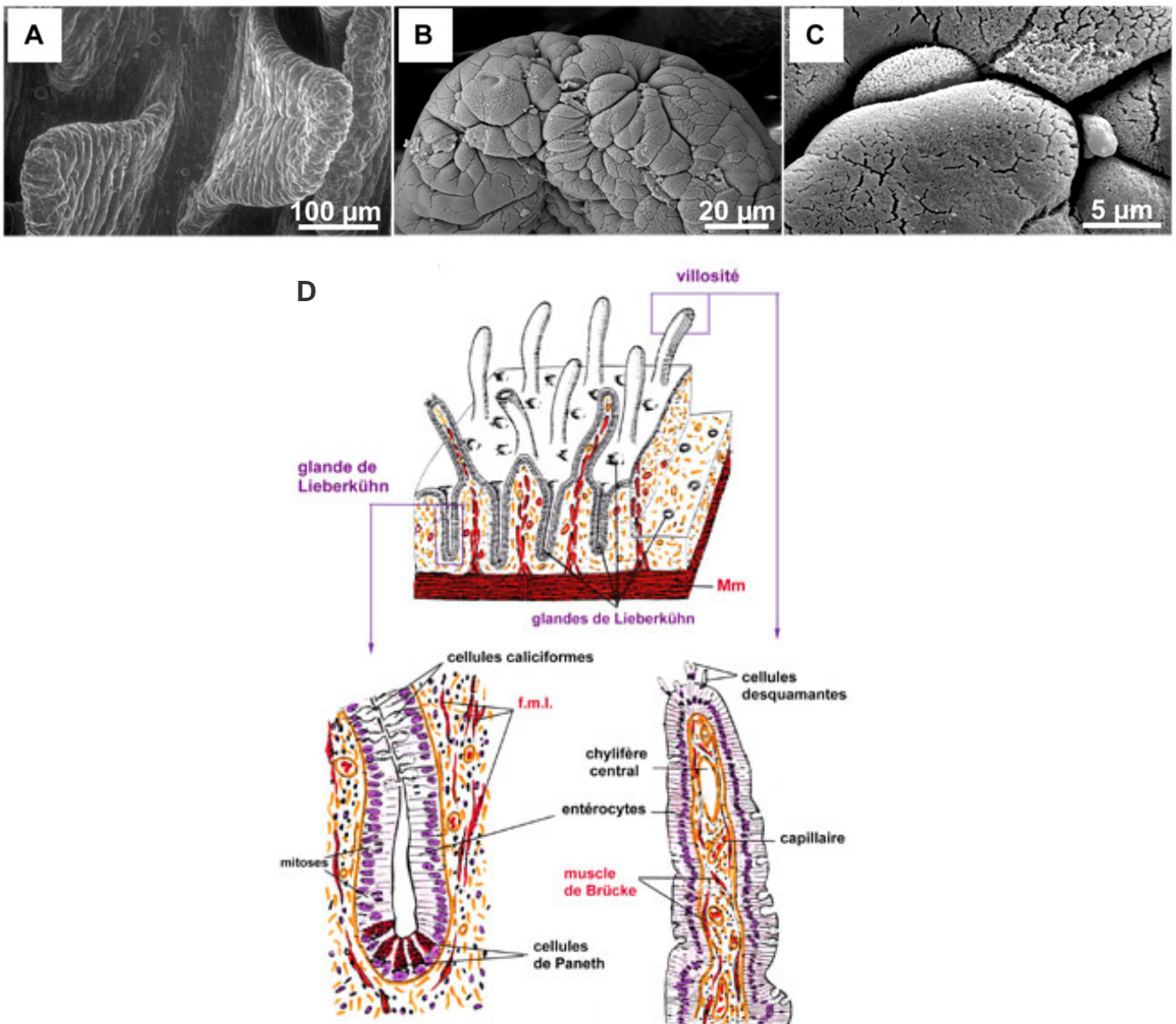


Figure 12. Structure des villosités intestinales de rats.

Villosités intestinales en ESEM (A) et en CSEM (B et C). Schéma d'une villosité intestinale avec détails de la disposition des entérocytes sur le pourtour des villosités et des cryptes intestinales, d'après N. Vacheret, UCB Lyon, site internet consulté en 2008 (D).

La *lamina propria* est la couche de tissu conjonctif lâche situé sous l'épithélium. Elle borde tout le tube digestif et sépare l'épithélium de l'axe conjonctif des villosités ou chorion (Figure 12). Le chorion comprend des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des fibres musculaires lisses (Figure 13). Une artère parcourt les villosités le long de leur axe et donne naissance à un réseau de capillaires au contact de l'épithélium. Les produits de la digestion, après avoir traversé cet épithélium, se déversent dans le vaisseau lymphatique central ou chylifère central. L'axe des villosités est également parcouru de petits faisceaux de fibres

musculaires lisses issues de la couche interne de la *muscularis mucosae*, formant le muscle de Brücke, dont les contractions favorisent le contact de l'épithélium intestinal avec le chyme ainsi que le drainage lymphatique dans le chylifère central.

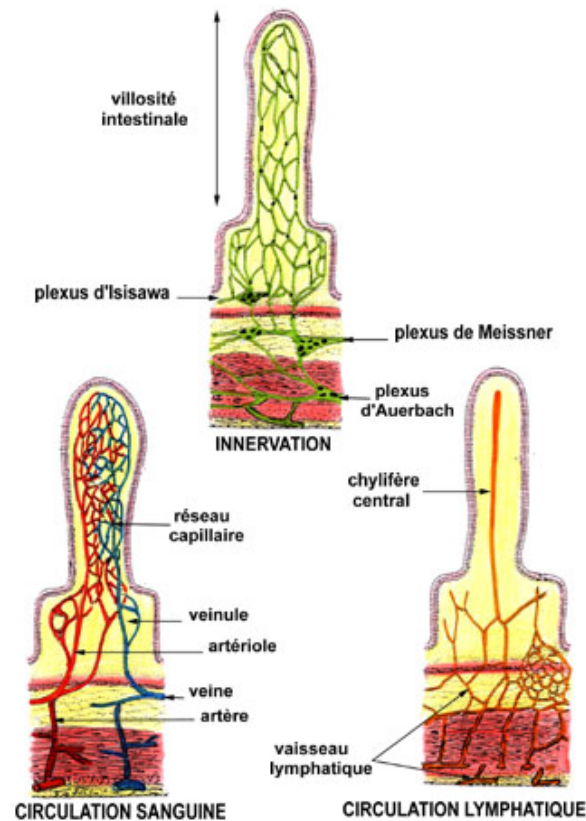


Figure 13. Représentation schématique des circulations sanguine et lymphatique et de l'innervation d'une villosité intestinale. (D'après N. Vacheret, UCB Lyon, site internet consulté en 2008).

a) Les entérocytes

Les entérocytes [terme issu du grec *enteron* : intestin, et *kutos* : cellule] sont les cellules majoritaires de l'épithélium intestinal (Figure 14). Ce sont des cellules cylindriques dont les sommets sont différenciés en microvillosités et qui assurent l'absorption des nutriments, de l'eau, des sels minéraux et des vitamines. Des systèmes de jonction assurent l'étanchéité des espaces intercellulaires latéraux (jonctions serrées ou zonula occludens) et la cohésion des cellules (*zonula adhérens* et desmosomes) (voir les revues de Richard et al., 1997 et Daugherty et Randall, 1999). Le noyau est situé à la limite entre le tiers moyen et le tiers inférieur (Figure 14). Enfin, au niveau basal, les entérocytes sont séparés par un espace

intercellulaire, qui s'élargit au passage des lipides absorbés pour former les espaces de Grünhagen (L'Hermite et al., 1996).

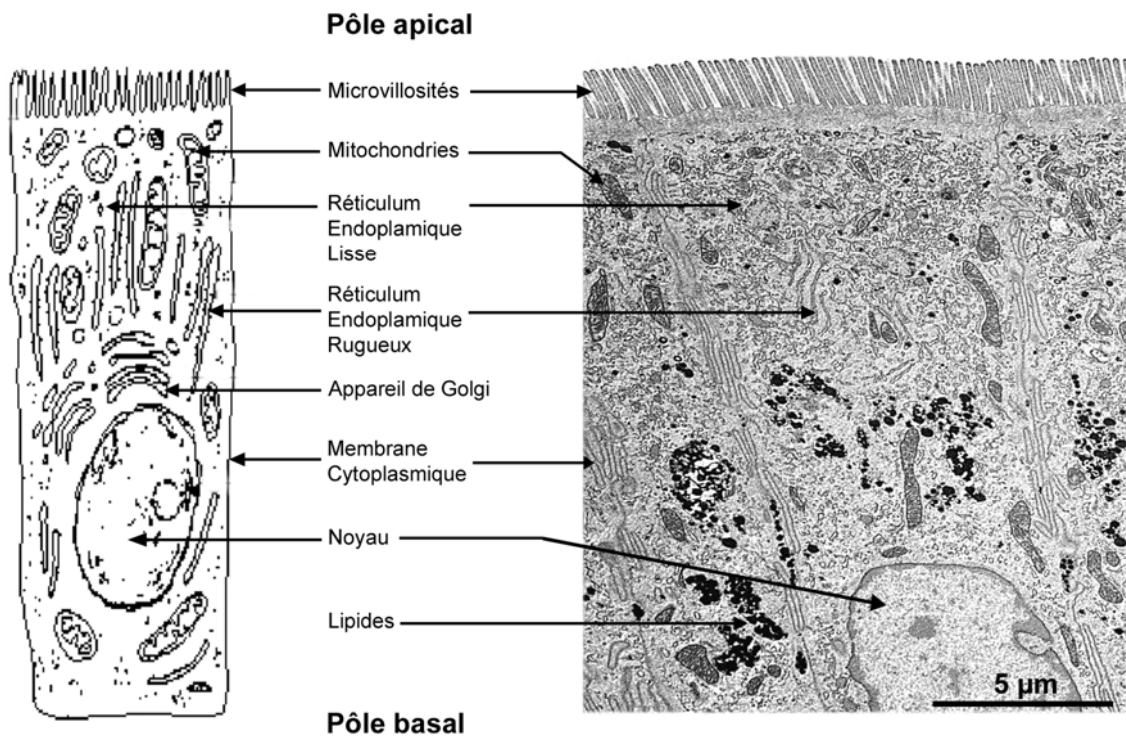


Figure 14. Schéma et image en MET d'un entérocyte avec ses constituants cellulaires.

La principale fonction des entérocytes est d'assurer le transport des produits issus de la digestion, c'est-à-dire le transit sélectif des nutriments entre la lumière de l'intestin grêle et le milieu intérieur, au travers des circulations sanguine et lymphatique. Les nutriments, molécules résultant de la digestion des aliments, traversent la membrane apicale au niveau des microvillosités. La traversée de la membrane cytoplasmique s'effectue par diffusion passive ou par transport actif. Cette diffusion passive est dite simple quand elle se fait au travers de canaux protéiques ou facilitée quand elle se fait en liaison avec des protéines de transfert. Le transport actif nécessite des structures moléculaires et enzymatiques adéquates ainsi que l'apport d'énergie, sous forme d'adénosine triphosphate (ou ATP). Après avoir traversé l'entérocyte, les nutriments sortent de la cellule et rejoignent le milieu intercellulaire, les glucides et les acides aminés pénètrent dans les capillaires sanguins alors que les lipides passent dans les canaux lymphatiques.

b) Le système endomembranaire des entérocytes

C'est un système complexe fait de plusieurs cavités limitées par une membrane, communiquant par l'intermédiaire de vésicules assurant le transport entre ces cavités et la membrane plasmique. Les compartiments de ce système possèdent des fonctions et des morphologies propres qui permettent de les distinguer. Ce sont principalement le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les lysosomes (voir Cau et Seïte, 1997).

Le **réticulum endoplasmique** peut être lisse ou rugueux (respectivement REL et RER). Le cytoplasme des entérocytes contient, dans sa région apicale, un REL abondant et formé de nombreux tubules qui lui donnent un aspect labyrinthique. Le REG est plus souvent réparti du côté basal de la cellule (Figure 14). Le REL et le REG sont des compartiments qui interviennent respectivement dans le stockage du calcium et dans la synthèse et la translocation des protéines membranaires solubles.

L'**appareil de Golgi** est composé d'un ensemble de vésicules et de saccules aplaties supranucléaires (Figure 14). Très schématiquement, il reçoit du matériel du réticulum endoplasmique tels des protéines assemblées, le modifie (glycosylation, ...) et l'exporte vers d'autres compartiments comme la membrane plasmique ou les lysosomes.

Les **lysosomes** sont des compartiments du système endomembranaire à fonction lytique capables de détruire tous les compartiments cellulaires, grâce à leur richesse en enzymes hydrolytiques à pH acide ($3,5 < \text{pH} < 5$) (voir Fain-Maurel, 1991). Ils ont pour origine les extensions sacculaires du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi. Les lysosomes primaires sont des sites de stockage enzymatique. Les lysosomes secondaires sont en activité et contiennent des hydrolases acides, des substrats à digérer et leurs produits de dégradation. Selon l'origine des substrats à digérer, ils peuvent être classés en vacuoles digestives (destruction d'un corps étranger à la cellule) ou autophagiques (destruction d'un corps appartenant à la cellule). Les vacuoles digestives conduisent à la formation de corps multivésiculaires. Les vacuoles autophagiques, qui peuvent se former par encerclement de la zone à éliminer, par englobement ou par fusion, aboutissent à la formation de corps résiduels. Cette digestion intracellulaire lyse complètement le matériel endocyté et les résidus non digestibles s'accumulent sous forme de corps résiduels. Ce sont parfois des enroulements de membrane, traces d'une digestion inefficace des lipides et d'organites en dégénérescence.

c) Les microvillosités

Les microvillosités ont pour fonction de faciliter le passage dans le sang des nutriments, issus de la digestion des aliments. Ce sont des prolongements cytoplasmiques réguliers disposés parallèlement les uns aux autres (Figure 15). Ils contiennent des microfilaments d'actine, reliés aux protéines transmembranaires par des protéines accessoires, comme la fibrine et surtout la villine (Kukulies et al., 1984 ; Coudrier et al., 1988). L'ensemble formé par le cytosquelette et ses protéines constitue alors sous la membrane un réseau d'actine appelé réseau terminal ou « *terminal web* » relié aux *zonula adherens* (Leeson, 1982) (Figure 15).

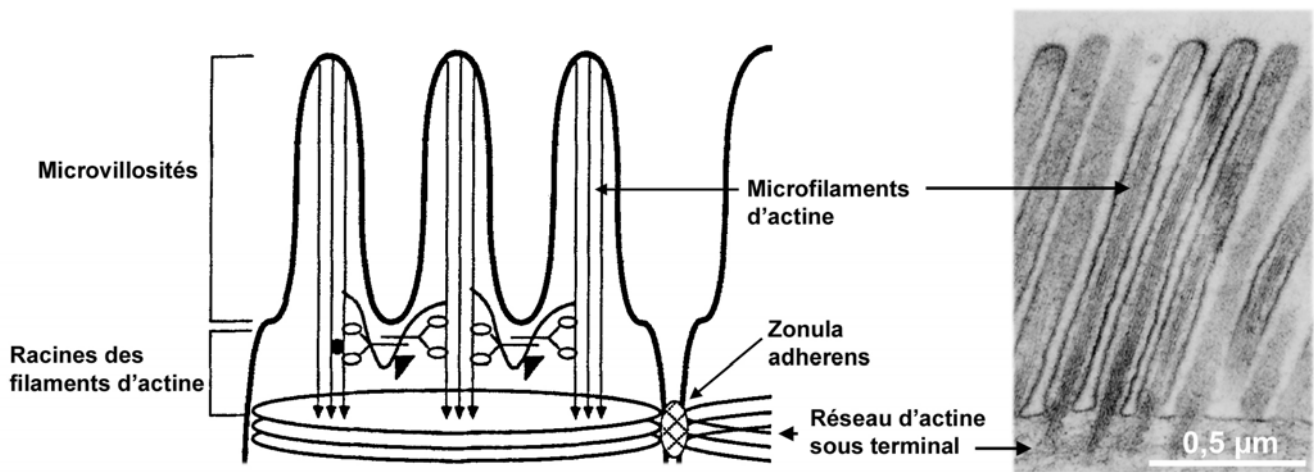


Figure 15. Schéma et image en MET de la structure des microvillosités.
(D'après Coudrier et al., 1988)

Le plateau strié, situé au pôle apical des entérocytes de l'épithélium intestinal, est appelé **bordure en brosse** et est constitué par un grand nombre de microvillosités de même diamètre et de même longueur (chez le rat, environ 0,1 à 0,2 µm et 1 à 2 µm respectivement) (Kukulies et al., 1984) (Figure 15).

Un **glycocalix** épais recouvre les microvillosités. C'est une couche de longs filaments glycoprotéiques. Ce dispositif augmente considérablement la surface membranaire du pôle apical de la cellule et, de ce fait, joue un rôle considérable dans les phénomènes d'absorption.

d) Les autres types cellulaires

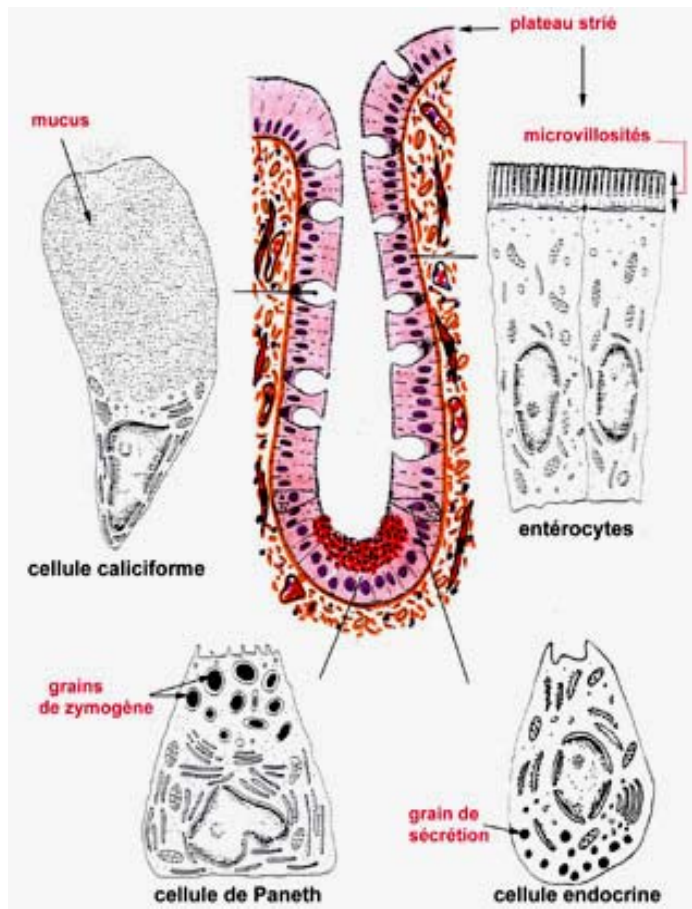


Figure 16. Schéma des différentes cellules retrouvées dans l'intestin grêle.
(D'après N. Vacheret, UCB Lyon, site internet consulté en 2008)

Il existe d'autres cellules au sein de la muqueuse de l'intestin grêle : les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules des glandes de Brünner et les cellules endocrines (Figure 16).

Les **cellules caliciformes**, de forme ovoïde, ont un cytoplasme rempli d'inclusions volumineuses de mucus (Figure 16). Elles sécrètent le mucus (dont la protéine de base est la mucine) tout au long de l'intestin grêle. L'épaisseur et la composition de la couche de mucus qui tapisse la bordure en brosse contribuent à la défense de la muqueuse contre l'adhérence et la pénétration des toxines et des bactéries. De courtes microvillosités sont présentes également au pôle apical de ces cellules.

Les **cellules de Paneth** sécrètent, aux travers de grains de sécrétion, du lysozyme, qui dégrade la paroi bactérienne, ainsi qu'une peptidase, et sont également riches en immunoglobulines (Figure 16).

Les **glandes de Brünner**, présentes dans le chorion duodéal, sont des glandes tubuleuses ramifiées, qui sécrètent du mucus et des bicarbonates nécessaires à l'action des enzymes intestinales.

Les **cellules endocrines** du tube digestif sont isolées et dispersées parmi les cellules des glandes exocrines depuis l'estomac jusqu'au côlon (Figure 16). Elles comprennent les cellules à sérotonine qui permettent la contraction du muscle lisse, les cellules à entéroglucagon, les cellules à gastrine qui stimulent la sécrétion pancréatique et permettent la contraction du muscle lisse, les cellules à cholécystokinine (ou CCK) qui entraînent la vidange de la vésicule biliaire quand des lipides sont détectés dans le duodénum, les cellules à somatostatine, les cellules à sécrétine, les cellules à VIP (vasoactive intestinal peptide), les cellules à GIP (gastric inhibitory peptide), les cellules à substance P, et les cellules à bombésine.

4) Les organes lymphoïdes

L'intestin grêle doit reconnaître et rejeter les substances toxiques ainsi que les toxines bactériennes, les bactéries pathogènes et les virus. Les formations lymphoïdes sont de plus en plus importantes le long de l'intestin grêle. Se limitant au manchon lymphoïde et à quelques follicules dans le duodénum, elles s'organisent en vastes plages, les plaques de Peyer dans le jéjuno-iléon (particulièrement dans la deuxième moitié de l'iléon).

Les plaques de Peyer sont un organe lymphoïde annexé au tube digestif formé de follicules lymphoïdes situés dans le chorion de la muqueuse et qui s'étendent dans la sous-muqueuse. En regard des follicules, l'épithélium perd ses villosités et forme un dôme où il existe entre les entérocytes des cellules M. Ces cellules possèdent au niveau de leur pôle basal des invaginations où viennent se loger des lymphocytes ; elles présentent alors les antigènes provenant de la lumière intestinale.

C. La flore bactérienne

Au niveau du duodénum, du jéjunum et de l'iléon proximal, la flore intestinale est plutôt clairsemée. L'iléon distal marque une zone de transition entre la flore clairsemée de l'intestin

grêle proximal et la flore luxuriante de l'intestin distal, plus abondante et anaérobie, où les concentrations de microorganismes sont élevées. À ce niveau, la valvule iléo-caecale joue un rôle important en empêchant le reflux de grandes quantités de microorganismes en provenance du côlon.

En temps normal, la flore bactérienne se trouve dans la lumière intestinale et dans la couche de mucus qui tapisse l'épithélium; elle est aussi fixée aux cellules muqueuses elles-mêmes, bien que le mucus sécrété par les cellules caliciformes et les immunoglobulines exercent une action antibactérienne.

3.2. Les fonctions

A. La digestion

Il y a deux phases dans la digestion. La première phase **intraluminale** met en jeu les enzymes pancréatiques et la bile : les sucres sont transformés en disaccharides, les protéines en petits peptides et en acides aminés, et les lipides en micelles, complexes de monoglycérides ou d'acides gras avec les sels biliaires. La deuxième phase est **intracellulaire**, plus précisément membranaire, elle parachève la digestion intraluminale et est assurée par des enzymes sécrétées au niveau de la surface d'échange que constituent les microvillosités.

L'intestin grêle reçoit les sécrétions pancréatiques et biliaires et participe à l'hydrolyse des aliments, au transport et à l'absorption des nutriments. La bile est sécrétée par le foie, puis collectée et concentrée dans la vésicule biliaire. Elle est excrétée dans le duodénum en présence de lipides dans le tube digestif sous l'action de la cholécystokinine. Les sels biliaires, par leurs propriétés émulsifiantes, permettent la digestion et l'absorption des lipides. Les sécrétions pancréatiques comportent des enzymes et une composante hydro-minérale (eau et bicarbonates). La sécrétion hydrominérale neutralise l'acidité du chyme sous l'influence de la sécrétine. De plus, l'intestin est responsable d'une sécrétion d'ions minéraux et d'eau, permettant le maintien de la fluidité du contenu luminal.

1) Absorption de l'eau et des électrolytes

L'intestin absorbe chaque jour de grandes quantités d'eau. Il assure alors un rôle critique dans le maintien de l'hydratation et l'équilibre acido-basique, ainsi que dans l'établissement d'un gradient de sodium grâce à des pompes spécifiques.

2) Absorption des glucides.

L'intestin agit sur les polysaccharides issus de l'amidon, les oligosaccharides, qui sont hydrolysés par les enzymes de la bordure en brosse. Des disaccharidases réduisent alors les sucres en monosaccharides, et ceux-ci sont absorbés par voie transcellulaire principalement, avec un transporteur sodium dépendant (Figure 17) (Richard et al., 1997). Les monosaccharides sont transportés à travers la cellule jusqu'au pôle basal où ils traversent la membrane basale de l'épithélium intestinal et gagnent la veine porte par laquelle ils sont drainés jusqu'au foie (Vander et al., 1995). Certains glucides comme la cellulose ne sont ni transformés ni digérés, et sont retrouvés dans les matières fécales.

3) Absorption des protéines

Les peptidases vont contribuer à dégrader les protéines pour former des acides aminés. Les protéines lysées sont soit exogènes, provenant de l'alimentation, soit endogènes, issues de la desquamation des cellules du tube digestif. Ces peptidases peuvent être gastriques, comme la pepsine, ou pancréatiques, et produisent des acides aminés et des oligopeptides. Les acides aminés sont absorbés par diffusion facilitée sodium dépendante (absorption conjointe à l'absorption en parallèle de sodium par des transporteurs spécifiques en fonction des gradients de concentration) (Figure 17) (Richard et al., 1997). Les oligopeptides sont quant à eux absorbés par transfert actif. Les acides aminés traversent la cellule et se retrouvent dans le système porte (Vander et al., 1995).

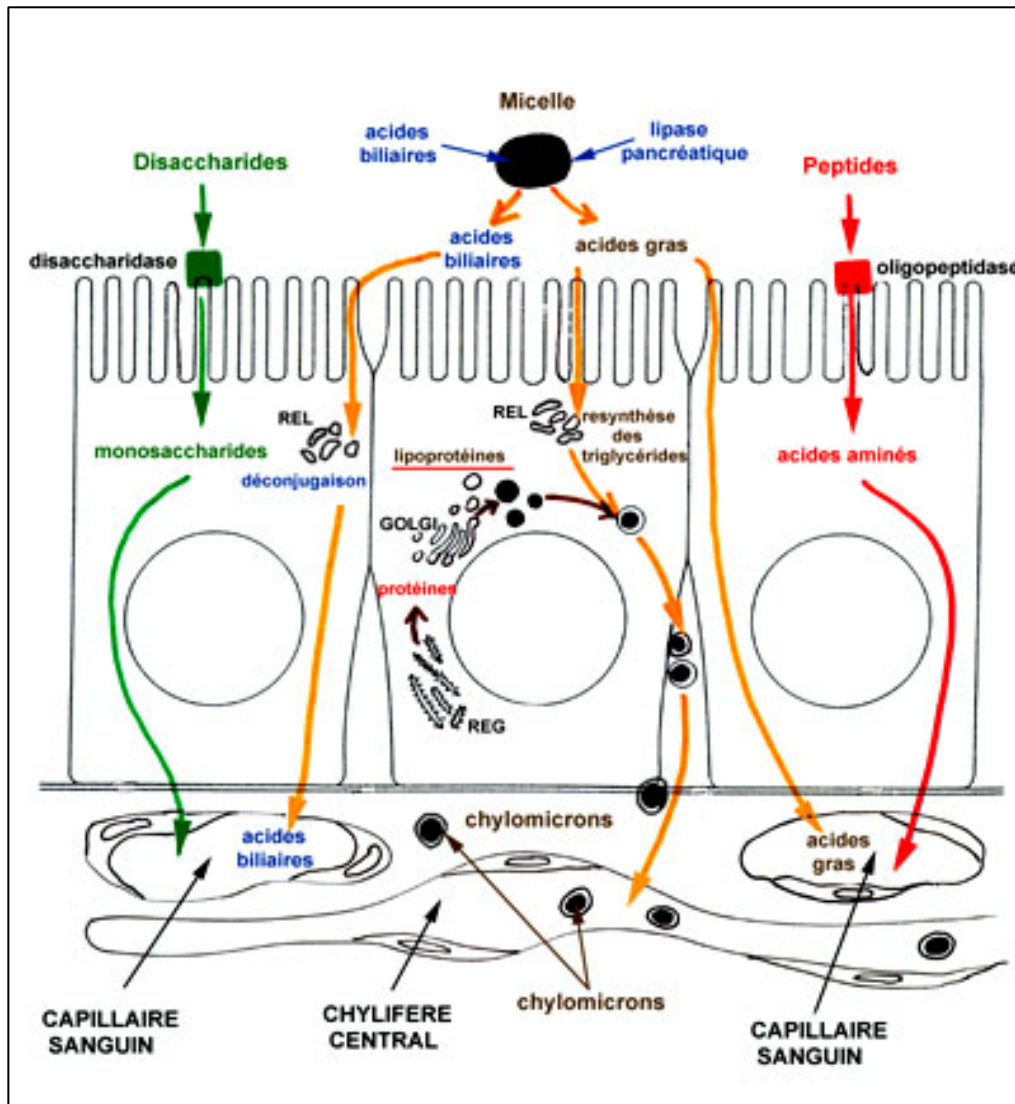


Figure 17. Schéma représentant les différentes voies d'absorption des nutriments par des entérocytes.
(d'après N. Vacheret, UCB Lyon, site internet consulté en 2008)

4) Absorption des lipides

a) Lipolyse et absorption des triglycérides

L'absorption des lipides est schématisée sur la Figure 17. Une grande majorité des lipides absorbés sont des **triglycérides**, le reste étant des phospholipides, des esters de cholestérol et des vitamines liposolubles. Pour être absorbés, les lipides doivent être hydrosolubles. Ils sont émulsionnés dans l'intestin puis hydrolysés, le duodénum permettant le contact entre les sécrétions biliaires et pancréatiques. Les sels biliaires sont amphipathiques et forment des micelles qui se chargent en monoglycérides, en acides gras à chaîne longue et en stérols (Tso et Balint, 1986). A ce niveau, la **lipase pancréatique** va assurer la dégradation des

triglycérides en acides gras et en glycérol ; cette enzyme est activée par une autre enzyme, l'entérokinase, localisée au niveau de la bordure en brosse (Cross et Mercer, 1993). Les enzymes digestives sont continuellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux des entérocytes et insérées dans la membrane de la bordure en brosse (Cross et Mercer, 1993). L'absorption des acides gras libres et du glycérol par les microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes se fait par diffusion passive, après dégradation de la micelle (Cross et Mercer, 1993 ; Petit et al., 2007 a).

b) Resynthèse des triglycérides

Dès leur pénétration dans la cellule, les acides gras sont pris en charge par une protéine spécifique, la **FABP** qui assure leur transport vers le réticulum et semble indispensable à leur réestérification (Friedman et Nylund, 1980 ; Habold et al., sous presse). Cette dernière se réalise dans le réticulum lisse après une activation par l'acyl-coenzyme A synthase (Cross et Mercer, 1993). A ce niveau, il se reforme des triglycérides et des phospholipides. Les mécanismes de transport et de réestirification du cholestérol sont également assurés par des protéines spécifiques (Richard et al., 1997).

c) Formation des chylomicrons

Une fois resynthétisés, les triglycérides et le cholestérol se retrouvent associés à des protéines synthétisées par l'appareil de Golgi, les **apolipoprotéines**, pour former des **lipoprotéines** et notamment des **chylomicrons** (Friedman et Nylund, 1980). Les lipoprotéines sont de grands complexes hydrosolubles de protéines et de lipides qui transportent massivement les lipides dans tout l'organisme (Tso et Balint, 1986). La coque externe est une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol et une ou plusieurs apolipoprotéines ; la partie centrale contient des triglycérides, des esters de cholestérol et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles (Hamilton et al., 1998). Les chylomicrons sont des lipoprotéines qui se forment en période de digestion, et sont la forme de transport des lipides de l'intestin grêle vers le foie (Tso et Balint, 1986 ; Hamilton et al., 1998).

d) Migration des chylomicrons

Les chylomicrons migrent ensuite vers les membranes latérales et passent dans les espaces intercellulaires entourant les entérocytes (Sabesin et Frase, 1977 ; Friedman et Nylund, 1980 ; Tso et Balint, 1986 ; Morel et al., 2004). A ce niveau, les lipoprotéines migrent vers le pôle basal de la cellule entraînées par le flux hydrique absorbé, et vont gagner des espaces intercellulaires basolatéraux appelés **espaces de Grünhagen** (Andrew et Sosa, 1947 ; L'Hermite et al., 1996 ; Kanny et al., 1996). Ces espaces sont élargis par le passage des liquides absorbés et des lipoprotéines qui pénètrent ensuite dans le chylifère central (Tso et Balint, 1986 ; Vander et al., 1995 ; Richard et al., 1997).

4) Absorption d'ions : les exemples du fer et de l'aluminium.

L'organisme contient un stock de fer maintenu constant, par un apport égal aux pertes, et l'absorption permet donc de réguler cet équilibre. Cette absorption se fait dans l'intestin grêle proximal, sous forme de fer ferreux Fe^{2+} transporté avec un proton. Si l'organisme est carencé en fer, les ions sortent de l'entérocyte et sont transportés dans le sang par la transferrine. En absence de carence, le fer absorbé incorporé à la ferritine reste dans la cellule et sera perdu à la mort de l'entérocyte.

Chez l'Homme, l'absorption gastro-intestinale d'aluminium est faible. Selon Pichard et al. (2005), elle est généralement de l'ordre de 0,1 à 1 %, dépend en grande partie de la biodisponibilité de l'aluminium aux différents pH de l'intestin et est liée à la forme ingérée et aux agents complexant présents. De plus, l'alimentation peut soit faciliter et augmenter l'absorption, en formant par exemple des complexes absorbables avec des acides carboxyliques comme l'acide citrique ou l'acide lactique, soit la réduire en formant des composés insolubles avec des phosphates ou des silicates.

B. Le déplacement du bol alimentaire

L'intestin grêle est un organe doté d'une **motricité intrinsèque**, assurant le transfert des aliments venant de l'estomac vers le côlon. Il contient une couche musculaire lisse faite de fibres orientées longitudinalement et de fibres orientées circulairement, dont les mouvements assurent le déplacement du bol alimentaire. Cette motricité est sous le contrôle du système

nerveux entérique composé de deux plexus nerveux présents dans la paroi intestinale, nommés plexus de Meissner et d'Auerbach, et des fibres nerveuses qui en émergent.

Les mouvements intestinaux sont de trois ordres : (1) les contractions segmentaires vont fragmenter le bol alimentaire ou chyme ; (2) les mouvements pendulaires vont permettre le mélange des aliments avec les sécrétions pancréatiques et biliaires ; (3) les mouvements péristaltiques provoqués par la contraction et la relaxation des couches musculaires assurent la progression du bol alimentaire tout au long de l'intestin (Vander et al., 1995). La motricité de l'intestin grêle a aussi comme effet mécanique de balayer les bactéries et contribue à maintenir les microorganismes à des concentrations faibles dans la partie proximale de l'intestin.

3.3. La physiologie intestinale lors du jeûne et de la réalimentation

Nous venons de voir que l'intestin est un organe fondamental dans la physiologie digestive. Le maintien de ses capacités d'absorption est donc essentiel afin d'assurer l'assimilation des nutriments. Dans la nature, il est fréquent que la prise alimentaire varie car elle dépend de la disponibilité des ressources. Or, face à certaines conditions environnementales contraignantes induisant une sous-nutrition, certains Primates se complémentent spontanément en argile (Krishnamani et Mahaney, 2000). Cette complémentation volontaire intervient lorsque l'animal est en situation de jeûne ou de réalimentation suivant un jeûne. Durant ces périodes, l'intestin est capable de s'adapter afin d'optimiser l'absorption, notamment au travers de modifications morphologiques et fonctionnelles.

A. Le jeûne alimentaire

Des jeûnes prolongés, observés naturellement chez les oiseaux sauvages, peuvent être également étudiés chez les rats de laboratoires. Physiologiquement, ils sont caractérisés par **trois phases métaboliques** (Goodman et al., 1980) qui sont réversibles (Le Maho et al., 1981;

Belkhou et al., 1991 ; Dunel-Erb et al., 2001). La première phase (**phase I**) est une phase rapide d'adaptation caractérisée par des niveaux élevés d'excrétion azotée, un épuisement des réserves corporelles de glycogène et une mobilisation progressive des réserves de graisse (Cherel et al. 1992). Cette phase courte est suivie d'une période d'épargne d'énergie (**phase II**) pendant laquelle la dépense énergétique dérive principalement de l'oxydation des lipides, tandis que les protéines sont épargnées (Robin et al. 1988). Le passage des réserves de lipides sous un seuil plancher marque l'entrée dans la phase suivante (**phase III**) caractérisée par une cassure métabolique puisque la contribution des lipides à la fourniture d'énergie diminue et que celle des protéines corporelles augmente (Le Maho et al., 1981; Robin et al., 1988). Ce changement de phase induit des changements comportementaux chez le rat (Koubi et al., 1991).

B. Modification de la muqueuse lors du jeûne

Au niveau intestinal, le jeûne physiologique induit de nombreux **changements morphologiques**. Au cours des différentes phases métaboliques du jeûne, la longueur, l'épaisseur et la densité des villosités ainsi que les dimensions des cryptes de Lieberkühn se réduisent (Dunel-Erb et al., 2001 ; Habold et al., 2003). En revanche, la bordure en brosse apicale des entérocytes est préservée au cours du jeûne prolongé et **la longueur des microvillosités augmente** (Dunel-Erb et al., 2001). Cette adaptation est considérée comme une réponse compensatoire pour maximiser les fonctions d'absorption au cours de jeûne. La *lamina propria*, étendue jusqu'aux sommets des villosités dans le cas de rats normalement nourris, est rétractée durant le jeûne d'au moins 100 nm, laissant une portion de la villosité privée d'apports lymphatiques et sanguins (Dunel-Erb et al., 2001). Dans ce cas, il y a un **élargissement de la base des entérocytes** qui ne sont alors plus en contact avec la *lamina propria*. Ces cellules pourraient se détacher progressivement de la membrane basale et éventuellement être relâchées dans la lumière intestinale (Dunel-Erb et al., 2001). Lors de la phase II, la prolifération cellulaire dans les cryptes et la migration des cellules le long de l'axe crypte-villosité diminuent, tandis que l'apoptose est maintenue au sommet des villosités (Habold et al., 2004).

Les animaux entrant en phase III ont atteint un niveau critique dans l'épuisement de leurs réserves de lipides et de protéines corporelles ; la modification de la muqueuse intestinale

pourrait expliquer leur résistance face à un jeûne prolongé. L'**intestin peut anticiper la réalimentation** afin d'accroître l'absorption des nutriments quand les animaux sont en phase III de jeûne (Habold et al., 2004, 2005, 2007). Pendant la phase III, période critique du jeûne, les diminutions concomitantes des cytokines et de la protéine Cdx2 (facteur de transcription qui stimule la différenciation et la polarisation des cellules épithéliales intestinales), ainsi que la diminution des cellules apoptotiques, permettent de conserver des entérocytes pour optimiser l'absorption nutritive dès que la nourriture est disponible et permettre de **reconstituer rapidement les réserves corporelles** (Habold et al., 2006). La bordure en brosse est également modifiée avec une augmentation de l'expression des gènes et des protéines des transporteurs sodium/glucose (SGLT1) et des petits peptides (PepT1) impliqués dans l'absorption nutritive (Habold et al., 2005). La muqueuse est alors prête pour la réalimentation. Ceci expliquerait pourquoi les réparations jéjunales sont complètes après seulement trois jours de réalimentation post-jeûne prolongé.

C. La réalimentation

Les processus impliqués dans la réalimentation se mettent en place dès que l'animal recommence à se nourrir quelle que soit la phase métabolique atteinte pendant le jeûne. La quantité et le type de nourriture ingérée dépendent justement de la phase métabolique atteinte avant la réalimentation (Thouzeau et al. 1995). Pour un rat, la durée nécessaire pour revenir à la masse initiale d'avant jeûne (ou réalimentation totale) est équivalente au temps mis pour arriver en phase III (Dou et al., 2001). La réalimentation totale augmente significativement la masse sèche de l'ensemble estomac-intestin, suggérant que le **tube digestif a retrouvé une efficacité complète** (Dunel-Erb et al., 2001). D'importantes gouttelettes lipidiques sont observées dans les entérocytes après seulement deux heures de réalimentation, illustrant le fait que l'absorption lipidique est rapidement optimale (Habold et al., 2007). Au début de la réalimentation, par comparaison aux protéines et carbohydrates, les lipides exercent un effet stimulant pour la régénération de la muqueuse (Buts et al., 1990).

D'un point de vue morphologique, **la réalimentation inverse les changements intestinaux induits par le jeûne** (Buts et al., 1990 ; Dunel-Erb et al., 2001 ; Dou et al., 2001). A la fin de la réalimentation, les villosités et les microvillosités retrouvent une taille

comparable à celle de l'état d'avant-jeûne (Dunel-Erb et al., 2001). Après un jour de réalimentation, la *lamina propria* commence à s'allonger et à combler l'écart sous la muqueuse, et l'élargissement basal des entérocytes, observé durant le jeûne, disparaît (Dunel-Erb et al., 2001). Bien que les deux phénomènes soient concomittants, la restauration rapide de la muqueuse intestinale semble s'expliquer préférentiellement par une réaction mécanique dans la *lamina propria* plutôt que par un changement de la morphologie des entérocytes (Habold et al., 2007). L'activité de certaines enzymes, telle la disaccharidase, augmente fortement (Yamada et al., 1986).

Ainsi, en conclusion, nous pouvons retenir que l'évolution de la muqueuse du jéjunum chez le rat au cours du jeûne, et sa restauration rapide lors de la réalimentation apparaissent comme **une réponse de l'intestin quand la disponibilité en nourriture varie**, comme cela peut être le cas chez les animaux hibernant (Dunel-Erb et al., 2001). Les modifications morphologiques induites dans la muqueuse intestinale durant le jeûne et la réalimentation témoignent de la grande flexibilité de l'intestin grêle, capable de s'adapter à l'absence ou à des quantités variables de nourriture ingérée.

BUT DE L'ÉTUDE

Considérées dans leur ensemble, les données bibliographiques sur la géophagie et l'ingestion d'argile au sens large, montrent que les argiles ingérées ont un réel impact sur le système digestif. Leur action se situe essentiellement à deux niveaux : **(1) en assurant une protection de la muqueuse intestinale, et (2) en facilitant l'assimilation des nutriments.**

- Le premier but, abordé au niveau de l'organisme entier, était d'observer les effets d'une ingestion spontanée en kaolinite fournie sous forme de complément librement accessible, lors de différents régimes alimentaires en suivant **(1) la consommation quotidienne des animaux**, et **(2) les effets de cette complémentation sur la prise de masse des animaux**.
- Le second but, abordé au niveau de la muqueuse intestinale, était d'observer les effets d'une telle complémentation sur la morphologie et le fonctionnement de la muqueuse de l'intestin grêle. Il s'agissait d'étudier **(1) l'état, la répartition et la disposition des argiles ingérées**, transportées dans la lumière intestinale, et amenées au contact de la barrière intestinale, et **(2) l'évolution morphologique de la muqueuse intestinale**, afin de voir si la complémentation contribue à l'optimisation des capacités absorbatives.

Afin de résumer l'approche abordée dans notre étude, les buts poursuivis ont été représentés sur le schéma de la figure 18.

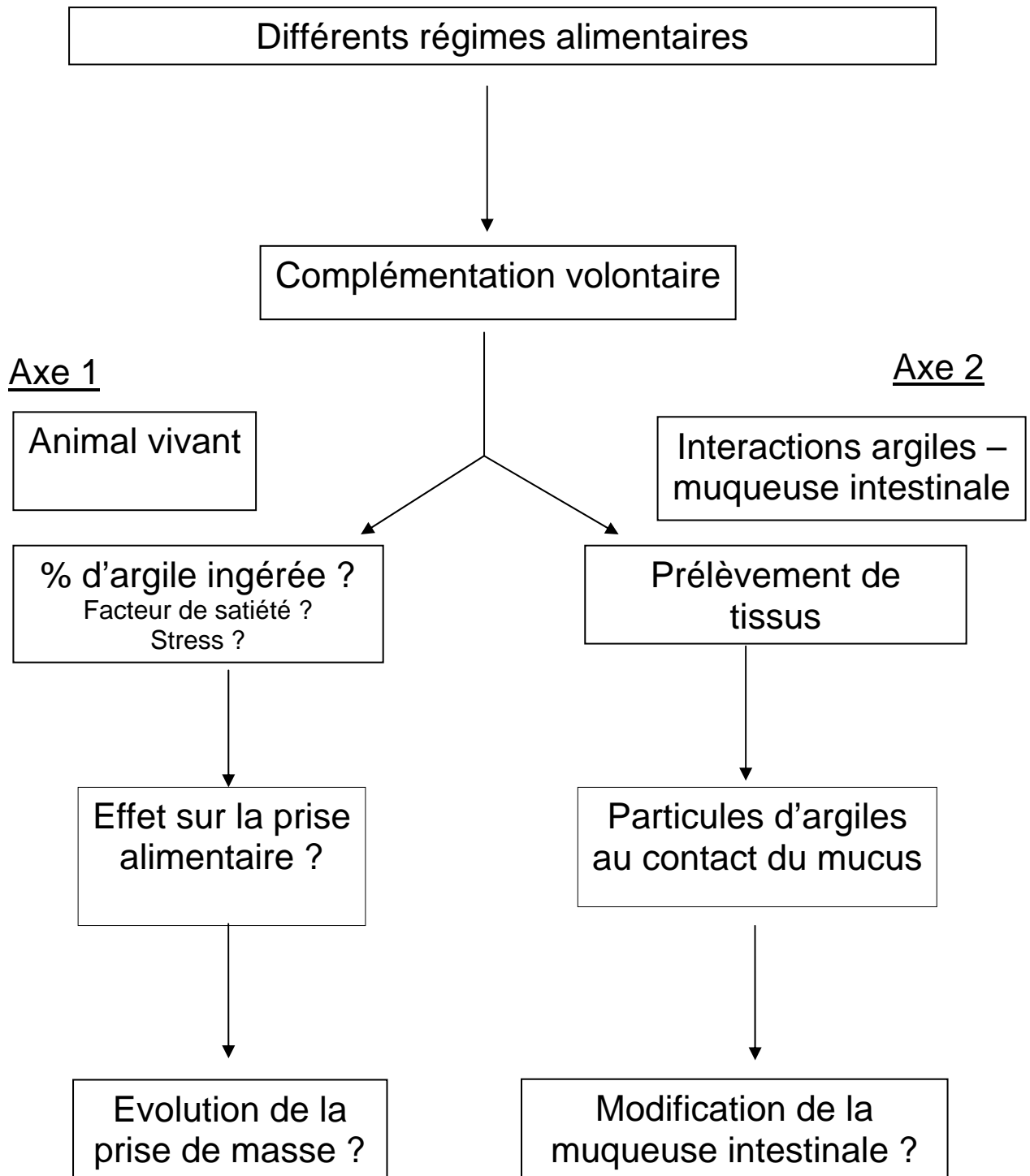


Figure 18. Schéma explicatif des deux axes suivis dans cette étude.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

4. EXPÉRIMENTATION ANIMALE

Pour essayer de comprendre les effets d'une complémentation en argiles sur la physiologie des Mammifères, nous avons entrepris des études en laboratoire sur des rats. Les argiles utilisées ont été essentiellement la kaolinite et ponctuellement la montmorillonite. Pour démarrer ces travaux et évaluer l'impact de ce type de complémentation en fonction de la quantité de nourriture ingérée, nous avons privilégié 4 régimes alimentaires différenciés :

- (1) une alimentation standard avec apport de nourriture *ad libitum* sur le long terme,
- (2) un jeûne alimentaire prolongé,
- (3) une phase de réalimentation, libre ou restreinte, consécutive à un jeûne prolongé, et
- (4) un régime restreint en nourriture à hauteur de 75 %.

Les consommations en croquettes d'aliment standard ou d'argile, ainsi que l'évolution de la masse des animaux (gain ou perte) ont été suivies quotidiennement tout au long des expériences.

4.1 Animaux

A. Conditions d'hébergement

Des rats mâles de souche Wistar (Charles Rivers, Lyon, France) ont été installés pour toute la durée des expériences dans des cages individuelles situées dans une pièce à environnement contrôlé ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-60% d'humidité, cycle jour/nuit de 12h avec une période diurne de 08h00 à 20h00). Le sol des cages était équipé d'une grille métallique pour récupérer chaque jour tous les fragments non ingérés d'argile et de nourriture et minimiser la coprophagie. Les animaux ont eu un accès continu à l'eau (eau du robinet) et variable à la nourriture selon les conditions expérimentales (jeûne, restriction alimentaire, alimentation à volonté). Nous avons utilisé des granules standards A03 (UAR, Epinay-sur-Orge, France) composée de 23 % (% en masse) de protéines, 51,1 % d'hydrates de carbone, 4,3 % de lipides, 4 % de cellulose, 5,6 % de minéraux, et 12 % d'eau. Les animaux ont été pesés

chaque matin entre 08h00 et 09h00, ainsi que l'eau, la nourriture et les morceaux d'argile excédentaires ($\pm 0,1$ g). Les animaux ont été adaptés pendant 7 jours avant le début de chaque expérimentation avant d'être répartis aléatoirement dans les différents groupes expérimentaux.

B. Méthodes d'euthanasie

Tous les animaux ont été euthanasiés à la fin des expériences. Durant les premières expériences, les euthanasies ont été effectuées par décapitation consécutive à un choc crânien (concussion). Lors de l'expérience de restriction alimentaire, les euthanasies ont été effectuées par décapitation consécutive à une anesthésie à l'isoflurane, selon les recommandations du Comité Régional d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (C.R.E.M.E.A.S.) (numéro d'agrément: AL/03/12/05/08).

4.2. Argile

Les argiles (kaolinite ou montmorillonite) présentées aux animaux sont des argiles commerciales (Argiletz, Lisy-sur-Ourcq, France), déjà utilisées dans des travaux précédents (Williams et al., 2004). Elles ont été préparées sous forme de blocs de taille centimétrique proche de celle des croquettes de nourriture standard. Pour réaliser ces blocs, les poudres de kaolinite ou de montmorillonite ont été mélangées avec de l'eau distillée. Les pâtes obtenues ont été étalées sur une épaisseur de 1 à 2 centimètres dans un moule plat, puis ont été séchées dans un four à $38 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant au moins 2 jours pour former une masse compacte débitée ensuite en morceaux.

Dans toutes les expériences, la nourriture et l'argile ont été données dans des pots séparés et complétés chaque jour d'expérience. Ainsi les animaux disposaient quotidiennement de plus de 100 g de croquettes – excepté dans les expériences de jeûne et de restriction alimentaire où les apports de nourriture étaient limités – et environ 50 g de kaolinite ou de montmorillonite. Pour faciliter les comparaisons avec les études précédentes (par exemple Cabezos et al., 2008), les consommations ont été indiquées en g/j et en % de complémentation (masse d'argile ingérée par rapport à la masse solide totale ingérée quotidiennement). Les

pourcentages moyens de complémentation volontaire présentés dans notre étude prennent en compte les consommations en argile du premier au dernier jour de chaque expérience.

4.3. Procédure de jeûne et de réalimentation

L'entrée des animaux dans les trois phases du jeûne a été déterminée par le calcul de la perte de masse corporelle spécifique quotidienne dM/Mdt (g/kg/jour) [dM représente la perte de masse durant $dt = t_1 - t_0$ et M est la masse corporelle à t_0] (Belkhou et al., 1991 ; Cherel et al., 1992 ; Dunel-Erb et al., 2001). Typiquement et en présence d'eau, les rats mâles de souches Wistar pesant 380 g lors de la mise à jeun atteignent le début de la phase III (P3) en environ 9 jours et à la masse de 250 g. Lors des expériences de réalimentation, les animaux ont été réalimentés dès l'entrée en P3 jusqu'au retour de l'animal à sa masse initiale d'avant jeûne.

Ces expérimentations ont satisfait aux « Principes de soins aux animaux » (publication n° 86-23), révisée en 1985 des NIH (National Institutes of Health) et avec la législation courante (L87-848) sur l'expérimentation animale en France. Les critères utilisés pour stopper le jeûne des groupes en phase III ont été : la perte de masse corporelle (>30%), l'augmentation de l'activité locomotrice diurne, l'érection des poils, et 2 jours consécutifs de vitesse accrue de la perte de masse corporelle.

4.4. Régimes alimentaires des différents groupes expérimentaux

Expérience 1. Complémentation à long terme

Les effets d'une complémentation libre en kaolinite ou en montmorillonite sur le long terme ont été abordés à partir de deux expériences menées successivement, et dont la durée totale a été fixée à quatre semaines (28 jours) comme cela avait déjà été fait dans des études antérieures de complémentation (Grosicki et Kowalski, 2003).

L'expérience 1a a été menée sur des rats pesant 350 ± 5 g au début de l'expérimentation. Deux groupes ont été considérés. Les animaux témoins constituant le premier groupe, ont été

alimentés juste avec la nourriture standard *ad libitum* et euthanasiés au bout de 28 jours (NF28, n = 5). Les animaux du deuxième groupe (n = 15), ont été alimentés avec la nourriture standard et une complémentation *ad libitum* en kaolinite : un premier lot a été euthanasié après 7 jours (durée moyenne de prescription des médicaments antidiarrhéiques) (Kao7, n = 5) et un second après 28 jours (Kao28, n = 10).

L'**expérience 1b** a été menée sur des rats pesant initialement 288 ± 8 g et les complémentations libres ont duré 28 jours avant l'euthanasie des animaux. Trois lots expérimentaux ont été différenciés : (1) nourriture standard seule fournie *ad libitum* (NF28, n = 10), (2) nourriture standard et kaolinite fournies *ad libitum* (Kao28, n = 10), (3) nourriture standard et montmorillonite fournies *ad libitum* (MMT28, n = 10).

Expérience 2. Complémentation durant le jeûne alimentaire

Deux groupes ont été différenciés. Dans le premier, des animaux préalablement alimentés avec la nourriture standard et pesant environ 350 ± 5 g, ont été mis à jeun jusqu'à la phase P3 du jeûne métabolique (NF+P3, n = 5) avec de l'eau comme seul apport. Dans le second, les animaux ont reçu une complémentation libre en kaolinite pendant 7 jours avant d'être mis à jeun avec ou sans kaolinite (Kao7+P3Kao et Kao7+P3, n = 5 respectivement) et ont été euthanasiés dès l'entrée en P3.

Expérience 3. Complémentation durant la réalimentation consécutive à un jeûne prolongé

Les rats ont reçu une nourriture standard jusqu'à ce que leur masse atteigne précisément 380 g. Ils ont été alors mis à jeun jusqu'à l'entrée en P3 puis ont été réalimentés jusqu'au retour à la masse d'avant jeûne (c'est-à-dire 380 g) avant d'être euthanasiés. La réalimentation a été appliquée selon 2 protocoles.

Expérience 3a : Deux groupes ont été constitués à partir de l'entrée en P3 : le premier a été réalimenté avec une nourriture standard seule donnée *ad libitum* (RéaNf, n = 9), le second a été réalimenté avec une nourriture standard et de la kaolinite, tous deux données *ad libitum* (RéaKao1, n = 9). Les animaux des deux groupes ont eu des durées de jeûne similaires (environ 10 jours).

Expérience 3b : Deux groupes ont été constitués successivement: le premier a été réalimenté avec une nourriture standard et de la kaolinite, toutes deux données *ad libitum* (RéaKao2, n = 7), le second a été réalimenté avec une quantité de croquettes contrôlée réduite, égale uniquement à la quantité moyenne ingérée par les animaux complémentés du groupe RéaKao2 (RéaNF(-), n = 13). Les animaux des deux groupes ont eu des durées de jeûne similaires (environ 8,5 jours).

Expérience 4. Complémentation durant une restriction alimentaire partielle

Les rats ont été sélectionnés pour l'expérience dès que leur masse a atteint précisément 380 g. Afin de comparer les résultats à des expériences antérieures (exemple Sakata, 1986), la durée de complémentation a été fixée à 14 jours avant euthanasie des animaux. Quatre groupes ont été différenciés sur deux séries successives. Les deux premiers groupes ont été nourris *ad libitum* avec une alimentation standard donnée soit sans complémentation (NF14, n = 6) soit avec de la kaolinite *ad libitum* (Kao14, n = 6). Les deux groupes suivants ont été traités dans un second temps et ont reçu seulement 75 % de la quantité moyenne de croquettes ingérée par les animaux du groupes NF14, l'un sans complémentation (NF14(-), n = 6) et l'autre avec de la kaolinite donnée *ad libitum* (Kao14(-), n = 6).

5. MÉTHODES ANALYTIQUES

Différentes techniques de microscopies photoniques et électroniques permettant des approches différentes mais complémentaires ont été utilisées pour visualiser et caractériser les particules d'argile à l'interface avec la muqueuse, et étudier la morphologie des cellules de la muqueuse intestinale. Des analyses de composition corporelle ont été faites également afin de quantifier les compositions lipidiques et minérales des animaux. Enfin, différentes techniques de dosages ont permis de mesurer les teneurs en aluminium dans les tissus et le sang, et de doser les concentrations en sérotonine et en leptine dans le plasma, impliquées respectivement dans le stress et la satiété.

5.1. Observations microscopiques

Deux types d'observations ont été faites : une analyse de surface de la muqueuse jéjunale et des particules d'argiles interagissant avec le mucus en microscopie électronique à balayage (MEB), et une analyse intratissulaire à l'échelle des cellules en microscopie photonique (MP) et en microscopie électronique par transmission (MET).

A. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations ont été faites à l'aide d'un microscope **Philips XL-30 ESEM** équipé d'un détecteur d'électrons secondaires Everhart-Thornley et d'un système de microanalyse chimique EDX (PGT Spirit, Princeton Gamma Tech). L'appareil peut être utilisé à des pressions variables. Il a été utilisé sous 2 modes : faible vide (mode environnemental ou ESEM) ou haut vide (mode conventionnel ou CSEM)

Après euthanasie, des échantillons du jéjunum ont été rapidement disséqués et préparés spécifiquement selon les nécessités des méthodes appliquées.

Pour l'observation en mode environnemental ou pression contrôlée (**ESEM**), les échantillons ont préalablement été soumis à une fixation chimique pendant quatre heures avec du paraformaldéhyde (PFA) 3 % dans du tampon phosphaté (PBS), puis à un lavage dans du PBS avant conservation dans de l'alcool. L'humidité relative sur la surface de l'échantillon a été maintenue à 17 % en fixant la température et la pression de la chambre à échantillon à 20°C et 3 Torr, respectivement. Les analyses chimiques élémentaires (spot ou carte-2D) ont été réalisées en mode **ESEM/EDX** sur des échantillons bruts. Le temps d'acquisition a été fixé à 100 s avec un temps mort de 10 – 15 %. Des analyses chimiques complémentaires ont été faites sur la surface des blocs de résine taillés pour la microscopie électronique par transmission, pour accéder à l'intérieur des villosités intestinales (voir utilisation des *block-faces* par Laue et al., 2005). Les spectres analytiques sont exprimés en nombre de coups en fonction de l'énergie des photons émis lors de l'excitation des éléments détectés.

Pour l'observation en mode conventionnel ou vide élevé (**CSEM**), les échantillons d'intestins ont été d'abord fixés dans du PFA 3% puis déshydratés progressivement dans une série de bains d'éthanol (70, 95 et 100°) puis d'hexamethyldishilazane (HMDS), avant d'être séchés à l'air. Les échantillons ont été ensuite métallisés à l'or durant 3 minutes à 50 mV (métalliseur Edwards Sputter). Des fèces ont également été observées, provenant de rats Kao7+P3Kao après 2 jours de jeûne et donc en absence de nourriture pouvant interférer avec les particules de kaolinite. Les échantillons, non déshydratés, ont été étudiés après séchage et métallisation.

B. Microscopie électronique par transmission (MET)

Les coupes ultra-fines de muqueuse intestinale ont été observées avec un microscope électronique par transmission **Hitachi 7500** équipé d'une caméra numérique Hamamatsu (Plateforme de Microscopie Electronique d'Imagerie *In Vitro*, Institut des Neurosciences, Strasbourg). Les échantillons ont été préparés selon 4 protocoles différents (le protocole utilisé est indiqué en fin de légende sur chaque photo présentée dans cette étude).

1) Protocole 1 classique

Les échantillons d'intestin obtenus au cours de nos expériences ont été traités selon un protocole classiquement utilisé au laboratoire et déjà décrit dans la littérature (Dunel-Erb et al., 2001 ; Lignot et al., 2005). Dans ce protocole, les échantillons sont fixés chimiquement dans une solution à 2,5 % de glutaraldéhyde diluée dans un tampon cacodylate à 0,1 M

(pH = 7,4) pendant au moins 2 heures à 4°C. Les échantillons sont ensuite post-fixés avec du tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon cacodylate pendant une heure, déshydratés dans une série de bains progressifs d'éthanol et passés dans un solvant de la résine, l'oxyde de propylène, puis inclus dans de la résine de Spurr ou de l'Araldite 502 (Polysciences). Des coupes ultra-fines (≈ 90 nm) sont placées sur des grilles de cuivre et contrastées avec de l'acétate d'uranyle (30 minutes) et du citrate de plomb (3 minutes).

Le protocole 1 permet une bonne imprégnation des tissus, mais il les déshydrate fortement et cette forte déshydratation entraîne l'élimination d'une majeure partie des lipides présents dans les échantillons. Pour améliorer la conservation des lipides dans les échantillons, 3 autres protocoles ont donc été utilisés de façon complémentaire.

2) Autres protocoles (2, 3 et 4)

Ces protocoles ont été appliqués aux échantillons des expériences 3 et 4 (complémentations lors de la réalimentation et lors d'une restriction alimentaire).

Les solutions de fixation ont été le glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4) (protocoles 2 et 4) ou dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) (protocole 3). Les échantillons ont été ensuite post-fixés avec du tétroxyde d'osmium à 2 % dans le tampon de fixation (protocole 2) ou dans du tampon imidazole (protocoles 3 et 4). Pour les trois protocoles, les échantillons ont été ensuite déshydratés dans des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes (50° à 100°), puis inclus dans l'Araldite.

C. Microscopie photonique (MP)

Les coupes semi-fines ($\approx 1.5 \mu\text{m}$) réalisées dans les blocs d'araldite contenant les échantillons prévus pour les analyses MET (protocole 1) sont déposées sur des lames enduites de poly-L-Lysine. Ces coupes sont ensuite colorées au bleu de toluidine et observées en MP avec le système d'analyse d'image **Zeiss Axioplan Imaging**. Elles ont été utilisées pour les mesures morphométriques.

D. Microscopie confocale (MC)

Dans le cadre de l'expérience 4, le marquage du cytosquelette d'actine des entérocytes par une toxine, la phalloïdine-tétraméthylrhodamine B isothiocyanate (phalloïdine TRITC), a été observé avec un microscope confocal **Zeiss LSM510 inversé**. Cette toxine se fixe aux filaments polymérisés d'actine F et les stabilise en s'opposant à leur dépolymérisation. Son couplage avec une molécule fluorescente permet sa visualisation (excitation entre 540-545 nm, émission entre 570-573 nm).

Après fixation par un mélange PFA 4%, glutaraldéhyde 0,1% dans du PBS, des coupes de tissus de 70 μm ont été réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000S). Après rinçages, ces coupes ont été incubées avec de la phalloïdine-TRITC à 4 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS pendant 20 min, lavées au PBS et montées dans du moviol. Le cytosquelette d'actine filamenteuse est observé au microscope confocal à l'aide d'un objectif x 40 (ouverture numérique 1,4) à immersion à l'huile après excitation avec un laser Hélium-Néon 543.

E. Mesures morphométriques

Afin de pouvoir comparer les données, toutes les mesures ont été faites à l'aide du logiciel SigmaScan (Jandel) sur des images provenant de coupes semi-fines (MP) et ultra-fines (TEM) d'échantillons traités avec le protocole 1.

1) Villosités

La longueur et l'épaisseur des villosités intestinales ont été mesurées à partir des photos prises en MP. La longueur des villosités a été mesurée du sommet jusqu'à la base au niveau de l'entrée des cryptes. La largeur des villosités a été déterminée au niveau de la limite entre le tiers supérieur et le tiers moyen, par rapport à la longueur totale de la villosité. Trois coupes semi-fines ont été utilisées par animal et 3 villosités ont été mesurées par coupe.

2) Entérocytes et microvillosités

Les mesures concernant les entérocytes et les microvillosités ont été faites sur des images obtenues en MET. Les largeurs des entérocytes, mesurées dans les expériences 1 et 3, représentent la distance entre deux jonctions serrées. La mesure des longueurs et largeurs des microvillosités a permis de calculer leur surface moyenne $[(2\pi \times \text{largeur}/2) \times \text{longueur}]$ et leur volume moyen $[(\pi \times (\text{largeur}/2)^2 \times \text{longueur})]$. Leur densité a été déterminée par la mesure du nombre de microvillosités par unité de longueur (μm) de la bordure en brosse. Enfin, les distances séparant la membrane plasmique du réseau d'actine terminal (= racines des microfilaments d'actine) ont également été mesurées, ce qui a permis de calculer la longueur totale des filaments d'actine constitutifs des microvillosités (longueur microvillosité + racines des microfilaments). Pour chaque animal, cinq mesures ont été réalisées par photo et cinq photos différentes ont été utilisées pour déterminer la moyenne des longueurs, largeurs, densités des microvillosités ainsi que des largeurs du réseau sous-membranaire.

5.2. Composition corporelle

A. Préparation des échantillons (lyophilisation, broyage)

Après prélèvement du jéjunum (soit environ 5 à 10 cm d'intestin grêle), les rats ont été lyophilisés (CHRIST Alpha 1-4 plus). Ce procédé permet d'éliminer l'eau contenue dans un échantillon, sous vide et à froid. L'eau des échantillons préalablement congelés (-20°C) est sublimée – passage direct d'eau solide en vapeur d'eau – avant d'être condensée au niveau d'un piège à une température inférieure (-65°C), situé entre les échantillons et une pompe à vide. La masse des animaux avant lyophilisation correspond à la masse fraîche, celle d'après lyophilisation à la masse sèche. Le pourcentage d'eau des animaux est calculé d'après la formule suivante :

$$\% \text{ en eau} = (\text{masse fraîche} - \text{masse sèche}) / \text{masse fraîche}$$

Les échantillons lyophilisés ont été broyés (RETSCH SM1 et ZM1) après avoir été congelés dans l'azote liquide (-196°C) afin de les rendre cassants. La poudre déshydratée obtenue permet de préparer les fractions aliquotes homogènes nécessaires aux analyses biochimiques.

Juste avant les dosages cette poudre est rehyophilisée pendant 48 heures afin d'éliminer toute trace d'eau résiduelle.

B. Dosage des lipides (méthode de Folch)

Cette méthode permet de déterminer la quantité de lipides totaux d'un échantillon (Folch et al., 1957). Les lipides totaux sont constitués en majorité de glycérides (mono-, di- ou tri-), de phospholipides et de stérols. Le principe de cette séparation est fondé sur le caractère hydrophobe des lipides. Elle s'effectue en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, les lipides contenues dans 1 g ($\pm 0,001$ g) sont extraits sous agitation (12 h) et mis en solution dans un mélange de solvants organiques (chloroforme/méthanol, mélange 2/1, vol/vol). La solution est ensuite filtrée afin de séparer la phase solide délipidée de la phase liquide contenant les lipides. A cette dernière fraction est ajouté du chlorure de potassium 0,9 % (un volume pour 5 volumes de phase organique). Deux phases se forment alors : une phase inférieure chloroformique contenant les lipides et une phase aqueuse supérieure constituée de méthanol et de la solution de KCl, comprenant les lipoprotéines ainsi que des sels minéraux. La phase supérieure est éliminée par aspiration pour ne garder que la phase chloroformique que l'on traite au Rotavapor. Sous l'effet d'une dépression et à une température de 44°C, le chloroforme est évaporé puis condensé dans un flacon de récupération. Il ne reste alors plus dans le récipient initial que les lipides totaux, dont la masse est déterminée par pesée (m_{lipides}). Le pourcentage de lipides contenus dans l'échantillon peut être calculé selon la formule suivante :

$$\%_{\text{lipidique}} = (m_{\text{lipides}} / m_{\text{échantillon}}) \times 100$$

Toutes les mesures sont effectuées en double afin d'évaluer la répétitivité des dosages. De plus, les fractions délipidées (30% d'entre elles) sont extraites des papiers filtres suivant le même protocole. Cette double extraction est effectuée afin de déterminer l'efficacité de l'extraction.

C. Dosage des cendres totales

Pour déterminer la composition minérale des carcasses, une quantité connue (de 1 à 1,5 g) de broyat lyophilisé est déposée dans un creuset porté à 500°C pendant 24 heures. Une combustion forte et prolongée va permettre de récupérer les cendres permettant de déterminer la quantité minérale totale présente dans l'échantillon selon la formule suivante :

$$\% \text{ minéraux} = (m_{\text{cendres}} / m_{\text{échantillon}}) \times 100$$

5.3. Mesures des concentrations en aluminium

Les teneurs en aluminium dans le sang et divers tissus ont été déterminées par absorption atomique dans l'expérience 1b. Les lyophilisats des rats de l'expérience 3 ont été analysés par spectrométrie de masse afin de déterminer les concentrations de plusieurs éléments métalliques dont l'aluminium.

A. Dosage par absorption atomique

Le dosage de l'aluminium a été effectué sur les échantillons de sang des animaux de l'expérience 1b. Ces échantillons ont été collectés dans des tubes héparinés après euthanasie des animaux. Le dosage de l'aluminium a également été effectué sur des échantillons de foie, de rein, de cerveau et d'os (crâne).

Les échantillons de tissus ont été brûlés à 105°C pendant 15 heures afin de déterminer leur contenu en eau. Ils ont ensuite été carbonisés/calcinés à 700°C pendant 7 heures. Après refroidissement, les cendres ont été dissoutes dans de l'acide nitrique ultra pur et chauffées à 110°C. Lorsque des fragments non dissous étaient encore visibles, l'acide nitrique a été évaporé et les échantillons ont été calcinés pendant 5 heures supplémentaires. Après refroidissement, les cendres ont été dissoutes à l'acide chlorhydrique concentré. Après dissolution complète, les échantillons ont été transférés dans des tubes de polypropylène et dilués dans 10 ml d'eau ultra pure. Les blancs ont été obtenus en utilisant les mêmes réactifs soumis au même traitement. Le contenu en aluminium a été déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique à four graphite ou GFAAS (Graphite Furnace

Atomic Absorption Spectrometry, **Varian Zeeman Spectra AA-400**) en utilisant une calibration réalisée à partir de concentrations standard et une correction de fond Zeeman. La limite de détection sur les échantillons digérés était de 1 µg/l.

B. Dosage par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique instrumentale d'analyse reposant sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments constitutifs d'un échantillon en fonction de leur masse atomique. Cette technique a été utilisée pour déterminer les teneurs en aluminium mais également celles en fer, manganèse, titane, chrome, cobalt, nickel, cuivre et zinc, dans les lyophilisats des animaux de l'expérience 3.

Pour l'analyse des lyophilisats, 0,5 g d'échantillon par animal ont été minéralisés avec 6 mL d'acide nitrique (Suprapur, Merck) en utilisant un four à micro-ondes (Multiwave 3000, Anton Paar) à l'aide d'une lampe 800W pendant 20 minutes et tenu pendant 15 minutes. Les échantillons ont été ensuite dilués 100 fois dans de l'eau milliQ (ultrapure) et la teneur en métaux a été déterminée par ICP-MS (Agilent 7500CE, Agilent) à partir d'une courbe d'étalonnage.

5.4. Mesure des concentrations plasmatiques de sérotonine et de leptine

Les dosages enzymatiques effectués au cours de cette étude dans le but de quantifier les concentrations plasmatiques en sérotonine et en leptine ont été réalisés à partir de kits d'analyse ELISA. Les dosages ont été effectués dans chaque cas sur du plasma issu d'échantillons de sang obtenus au moment de l'euthanasie des animaux.

En parallèle du dosage des échantillons, des mesures ont été réalisées sur des blancs et des substrats de calibration de concentrations connues afin de tracer une gamme étalon nécessaire à la détermination des concentrations en sérotonine et en leptine.

A. Dosage en sérotonine

Le dosage en sérotonine plasmatique a été réalisé à l'aide d'un kit d'analyse ELISA (CliniScience). Il comporte trois étapes dont la première est une phase d'acylation. Les échantillons sont placés dans des tubes contenant un réactif acyle, auxquels est immédiatement ajouté le tampon d'acylation. La seconde étape est une réaction immunologique : dans les puits recouverts d'anticorps anti-sérotonine, les solutions d'enzymes conjugués sont ajoutées à la solution acylée obtenue au cours de la première phase. La troisième et dernière étape est une réaction enzymatique au cours de laquelle les substrats sont ajoutés, puis une solution « stop » afin d'arrêter la réaction enzymatique nécessaire à la coloration des puits où il y a eu fixation entre les anticorps présents initialement et la sérotonine contenue dans les échantillons. L'absorbance, reflet de la concentration en sérotonine du plasma des rats, peut être lue à 405 nm.

B. Dosage en leptine

Le dosage en leptine plasmatique a été réalisé à l'aide d'un kit d'analyse ELISA (GenWay). Les échantillons sont incubés dans des puits de microtitration couverts d'anticorps dirigés contre la leptine. Après un lavage approfondi permettant d'éliminer les antigènes non liés, un anticorps polyclonal anti-leptine et couplé à la biotine a été ajouté. Après rinçage, de la streptavidine conjuguée à une enzyme, la peroxydase est ajoutée et se fixe à la biotine liée. Après un dernier lavage, une solution de peroxyde contenant le chromogène tetramethylbenzidine (TMB) est ajoutée. La peroxydase dégrade les molécules de H₂O₂, entraînant l'oxydation du TMB pour former un produit de couleur bleue. La réaction est arrêtée et le signal est amplifié au moyen d'une solution acide qui convertit le chromophore bleu en jaune. L'absorbance du produit jaune obtenu, proportionnelle à la concentration en leptine du plasma, est lue à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

5.5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Sigmastat (Jandel). Des comparaisons statistiques des données expérimentales ont été effectuées par des tests paramétriques (test-t et ANOVA à une voix couplés à des tests post-hoc de Tukey), et, dans certains cas, des tests non paramétriques (tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis

couplés à des tests post-hoc de Tukey). Les données sont présentées sous la forme « moyenne \pm écart type ». Le niveau de confiance statistique a été placé à $P < 0,05$; il n'est indiqué que lorsqu'il est significatif.

RÉSULTATS

6. CONSOMMATIONS – GAIN DE MASSE

Toutes les valeurs numériques obtenues dans ce travail sont indiquées sous forme de moyennes dans des tableaux récapitulatifs placés en annexes. Tous les résultats énoncés dans ce chapitre sont significatifs ($P < 0,005$).

6.1. Consommations de nourriture et d'argile et prises de masse lors des différents régimes alimentaires

A. Complémentation à long terme (28 jours)

1) Expérience 1a (Rats NF28, Kao7 et Kao28)

Les rats complémentés ont une consommation en argile continue dans le temps mais très hétérogène d'un individu à l'autre (écarts types importants). L'ingestion d'argile se reflète à l'observation des fèces plus ou moins colorées en blanc. Sur 28 jours, les rats NF28 et Kao28 présentent des gains totaux de masse corporelle et des consommations moyennes de croquettes similaires (Tableau 1-1).

Sur 7 jours d'auto-complémentation, les rats Kao7 consomment environ 9,5 % de kaolinite dans la ration totale solide ingérée quotidiennement avec un pic de consommation au premier jour (de 20 à 30 %). Sur 28 jours de complémentation, les rats Kao28 ingèrent 4,5 % de kaolinite. Deux rats Kao28 ont une grande consommation quotidienne (autour de 31 % de la ration), tout en présentant des consommations en croquettes et des gains totaux de masse corporelle similaires à ceux des autres rats Kao28 (Figure 19) (Tableau 1-1).

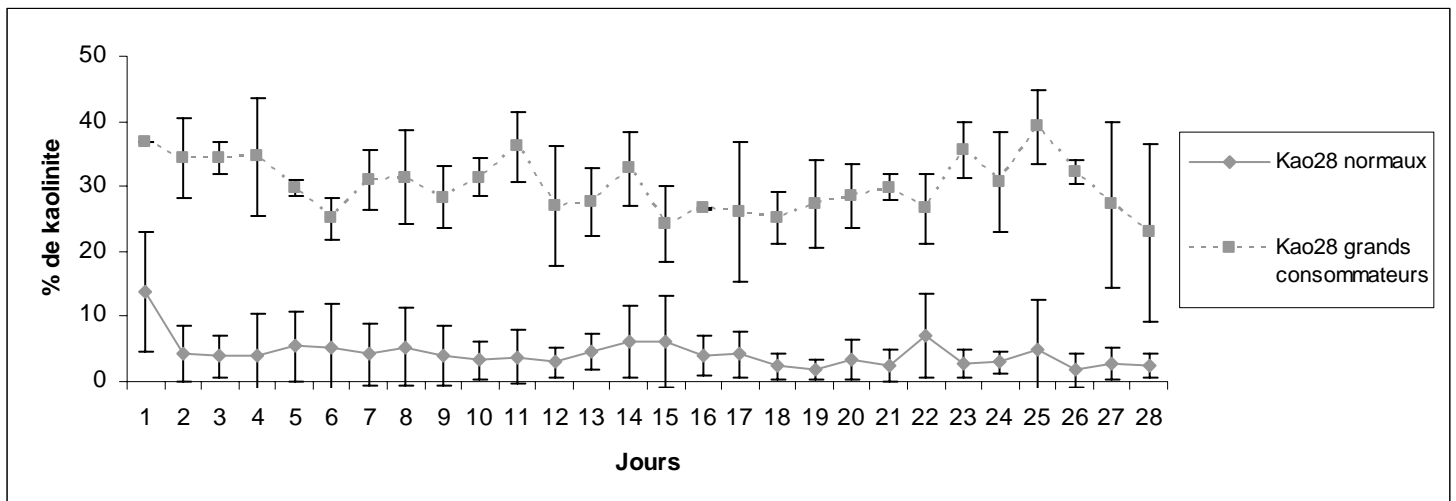


Figure 19. Pourcentages de kaolinite ingérée par les animaux Kao28. Sur ce graphique, les deux rats ayant des consommations élevées ont été séparés.

2) Expérience 1b (Rats NF28, Kao28 et MMT28)

Comme dans l'expérience 1a, les consommations en kaolinite et en montmorillonite sont régulières dans le temps pour un même individu bien qu'hétérogènes au sein des groupes.

Après 28 jours d'auto-complémentation, les rats NF28, Kao28 et MMT28 ont des gains totaux de masse corporelle et des consommations en croquettes similaires (Figure 20) (Tableau 1-2). Par rapport aux animaux NF28, les rats Kao28 ont tendance à diminuer leur consommation de nourriture sur la fin des 28 jours de complémentation.

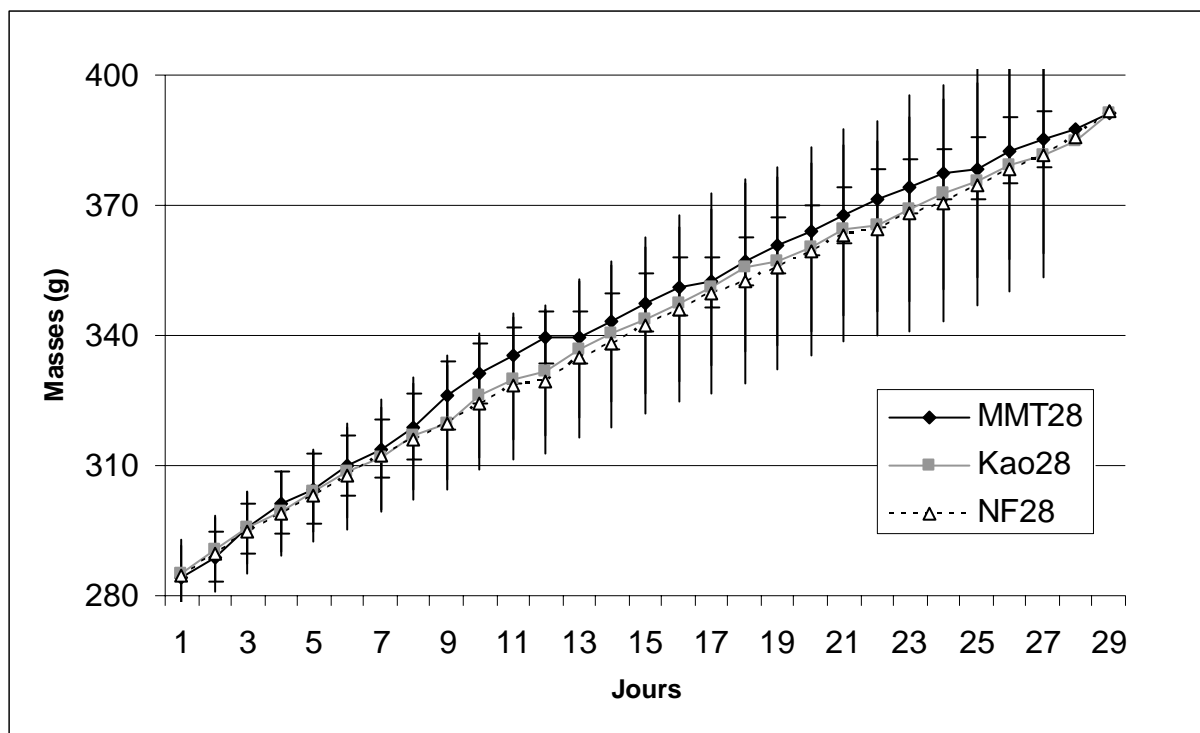


Figure 20. Suivi des masses des animaux NF28, Kao28 et MMT28.

Durant l'expérience, les rats Kao28 et MMT28 ont des pourcentages d'argile dans la fraction totale solide ingérée similaires (respectivement 5,3 et 6 %) (Figure 21) (Tableau 1-2).

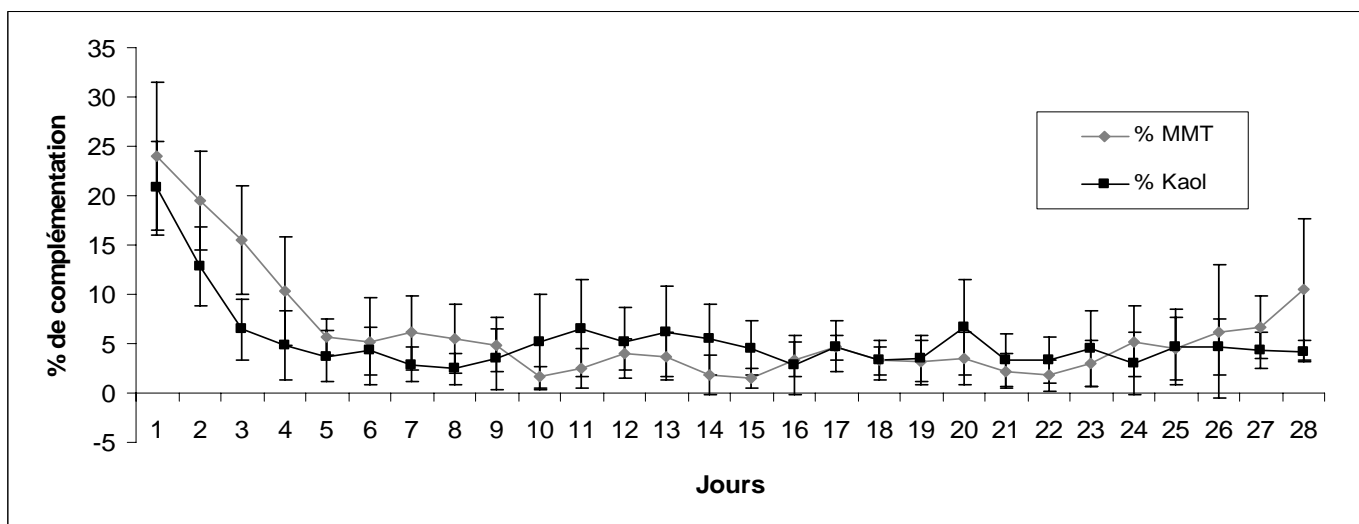


Figure 21. Pourcentage de kaolinite et de montmorillonite dans la fraction solide totale ingérée.

3) Adaptations aux conditions expérimentales

Lors des expériences 1a et 2, les rats ont été placés sur grille à deux moments différents. Les rats Kao7 et Kao28 ont découvert la kaolinite alors qu'ils étaient sur grille depuis 4 jours. Les rats Kao7+P3 et Kao7+P3Kao (expérience 2) ont été mis sur grille 4 jours avant le début de la complémentation en kaolinite. Les consommations de kaolinite entre les animaux découvrant l'argile lors de l'installation sur grille et ceux déjà sur grille sont significativement différentes du premier au troisième jour inclus, et similaires à partir du quatrième jour (Figure 22) (Tableau 1-3).

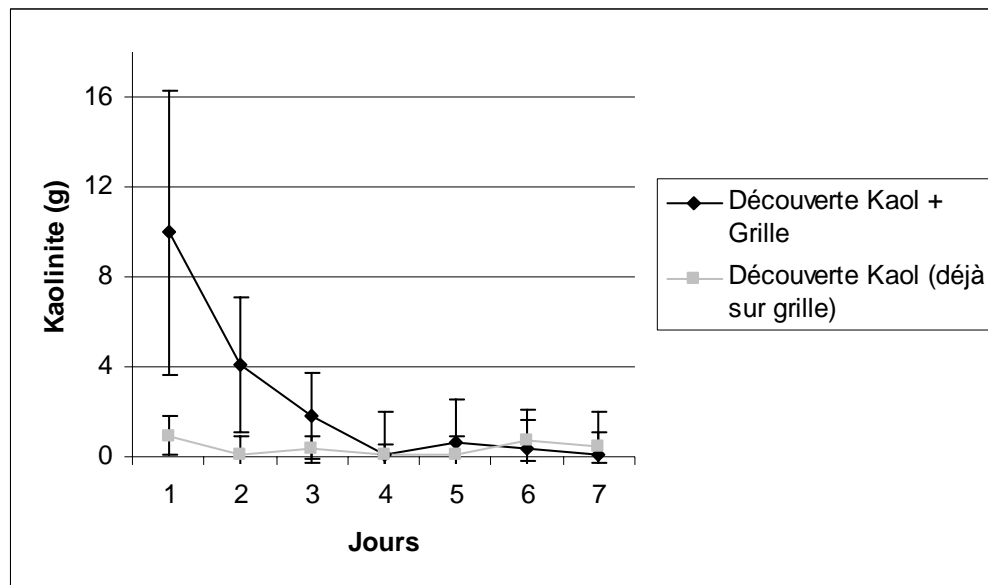


Figure 22. Consommation en kaolinite lors de la mise sur grille.

B. Complémentation lors du jeûne

Durant les 7 jours qui ont précédé la mise à jeun, les rats NF+P3, Kao7+P3Kao et Kao7+P3 ont eu des consommations en croquettes similaires. Les consommations en kaolinite des rats Kao7+P3Kao et Kao7+P3 ont été également comparables, avec des pourcentages d'argile ingérée de respectivement 6,7 et 4,7 (Tableau 1-4).

Les durées du jeûne jusqu'en phase III et les pertes de masse associées sont similaires pour les rats Kao7+P3Kao et Kao7+P3 (Figure 23) (Tableau 1-4).

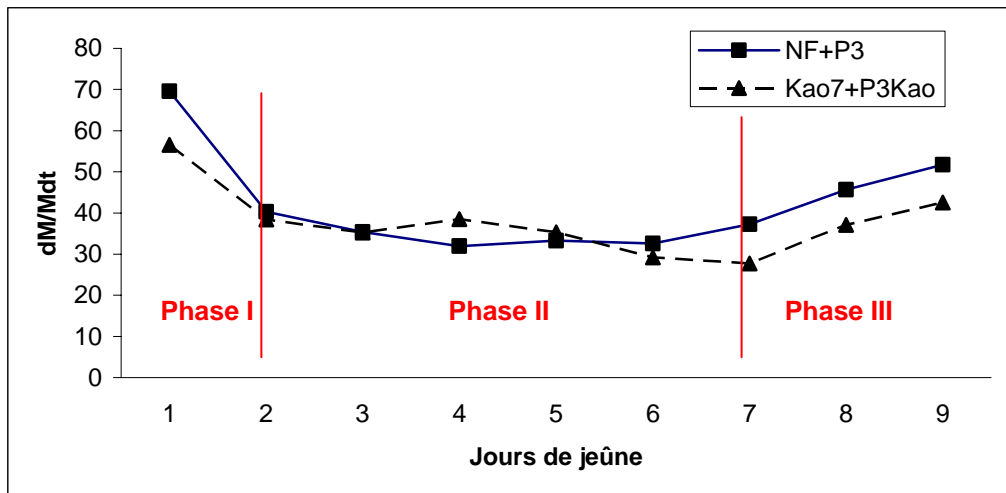


Figure 23. Taux journalier de perte de masse corporelle dM / Mdt (g / kg / jour) chez un rat NF+P3 et un rat Kao7 + P3Kao.

Les rats Kao7+P3Kao augmentent leur consommation en kaolinite au début du jeûne, avec un maximum le deuxième jour du jeûne suivi d'une diminution progressive (Figure 24).

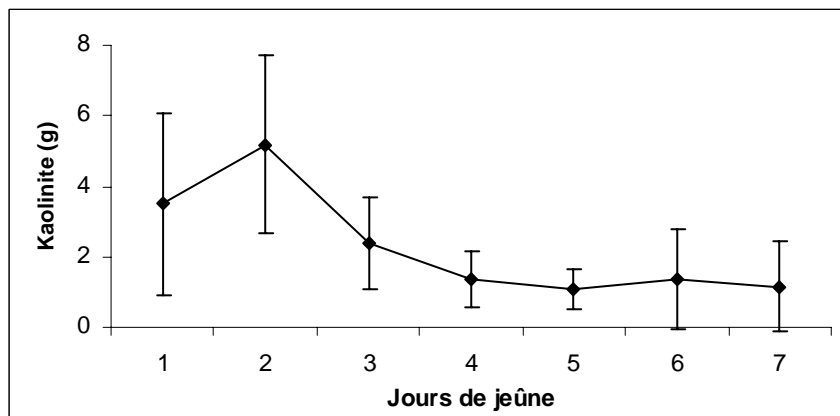


Figure 24. Consommation en kaolinite des rats Kao7+P3Kao.

C. Complémentation lors de la réalimentation

Les consommations en kaolinite des rats RéaKao1 et RéaKao2 diffèrent entre individus mais sont régulières au cours des phases de réalimentation.

1) Expérience 3a. Rats RéaNF et RéaKao1

Les rats RéaNF et RéaKao1 reviennent à leurs masses initiales dans des durées de réalimentation similaires (aux alentours de 9 jours, Tableau 1-5). Les gains totaux de masse corporelle ainsi que les gains de masse corporelle journaliers sont également similaires (Tableau 1-5).

En revanche, les rats RéaKao1 consomment 5,6 % de croquettes en moins que les rats RéaNF (Figure 25) (Tableau 1-5).

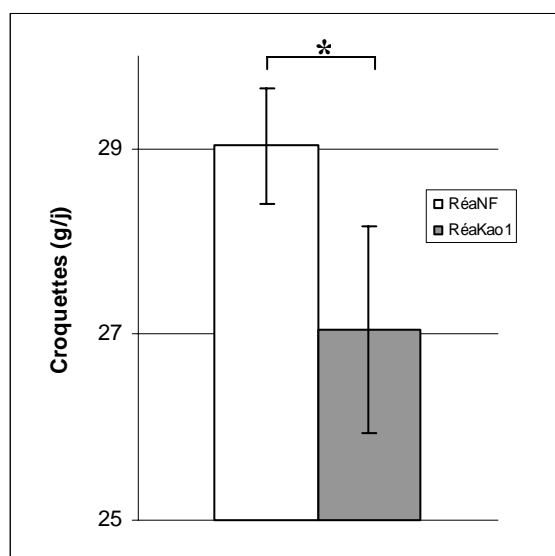


Figure 25. Consommation en croquettes des rats.

Les rats RéaKao1 consomment 5,2 % de kaolinite dans la fraction totale solide ingérée quotidiennement lors de la période de réalimentation. Leur consommation en argile se stabilise à partir du second jour puis reste stable jusqu'au retour à la masse initiale d'avant jeûne (Figure 26) (Tableau 1-5).

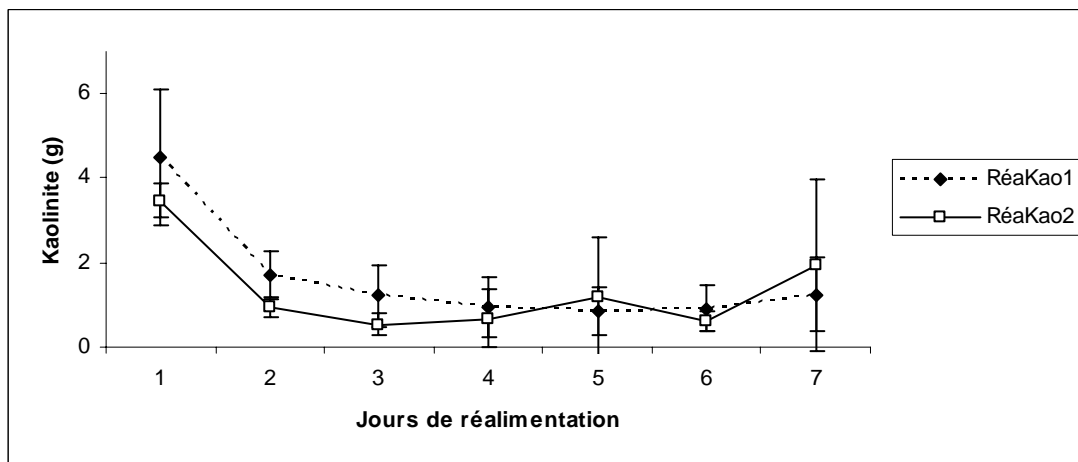


Figure 26. Consommation en kaolinite des rats RéaKao1 et RéaKao2.

2) Réalimentation 3b. Rats RéaNF(-) et RéaKao2

Les rats RéaNF(-) ont une durée de réalimentation totale plus longue de 15,6 % par rapport à celle des animaux RéaKao2 (Figure 27). Ainsi, le gain total moyen journalier de masse corporelle des rats RéaKao2 est supérieur de 14,9 % par rapport aux animaux RéaNF(-) (Figure 28) (Tableau 1-5).

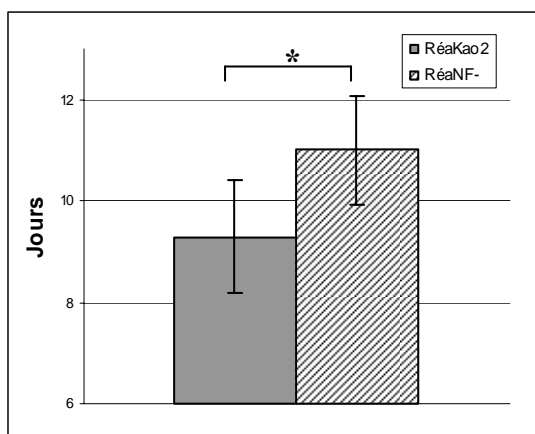


Figure 27. Durée de réalimentation des rats RéaKao2 et RéaNF(-).

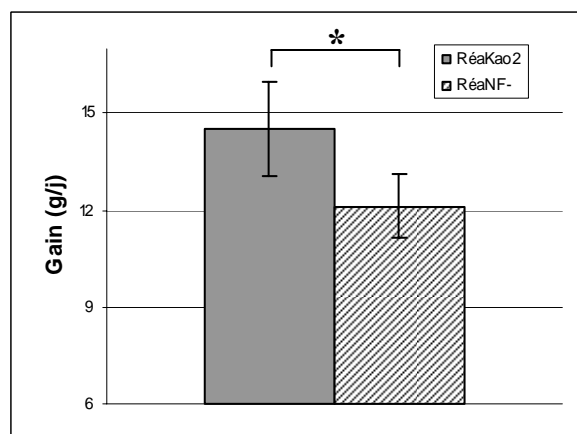


Figure 28. Gain moyen durant la réalimentation des rats RéaKao2 et RéaNF(-).

Les gains totaux de masse corporelle des rats RéaKao2 et RéaNF(-) lors de la réalimentation sont similaires tout comme les quantités quotidiennes moyennes de nourriture ingérée pour les deux groupes (Tableau 1-5).

Lors de la réalimentation, les rats RéaKao2 consomment 4,2 % de kaolinite dans la fraction totale solide ingérée quotidiennement. De la même façon que pour les rats RéaKao1, leur consommation en argile s'est stabilisée à partir du second jour puis est restée stable jusqu'au retour à la masse initiale d'avant jeûne (Figure 26) (Tableau 1-5).

D. Complémentation lors d'une restriction

La consommation en kaolinite des rats Kao14(-) restreints de 25 % est deux fois moins importante que celle des rats Kao14.

1) Animaux témoins (rats NF14 et Kao14).

Les rats NF14 et Kao14 ont une croissance similaire avec un gain de masse corporelle final non différent (Figure 29) (Tableau 1-6).

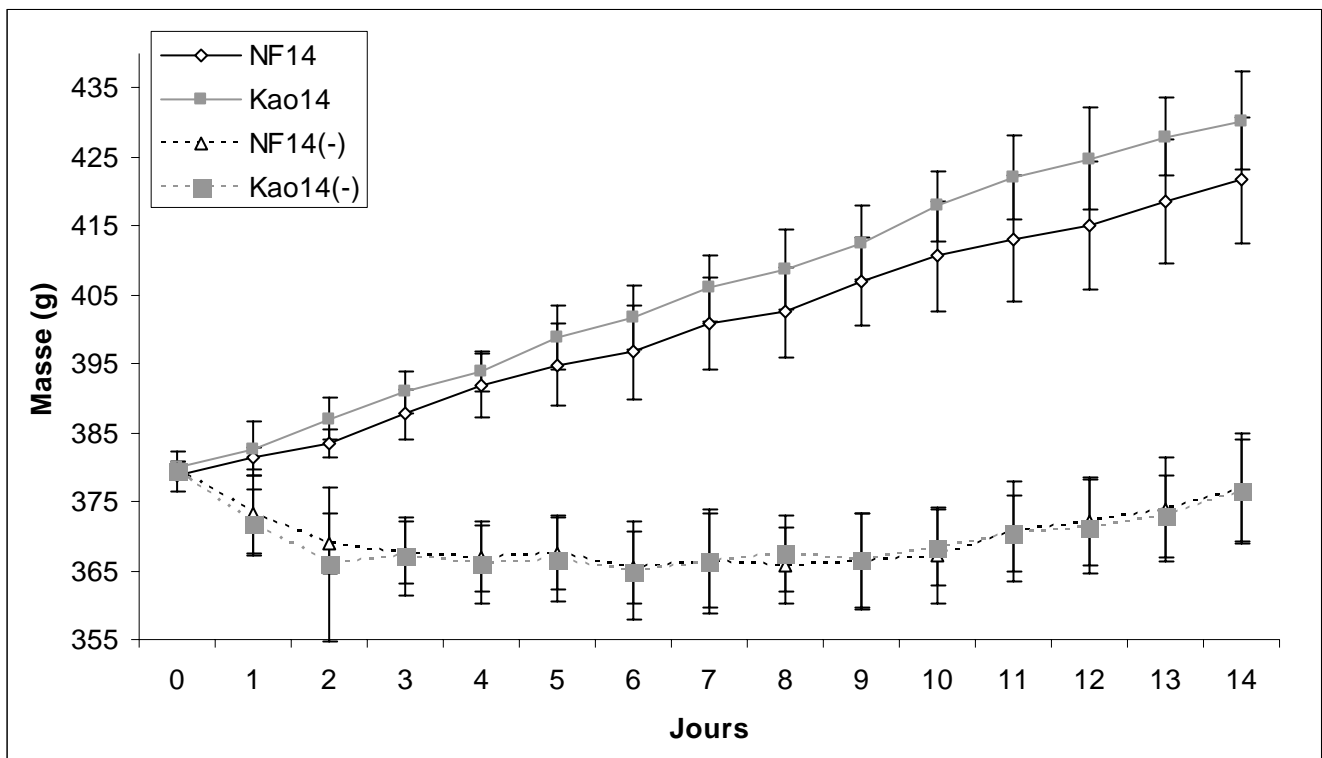


Figure 29. Gains de masse corporelle chez les animaux NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

Les rats NF14 et Kao14 consomment des quantités de croquettes similaires (Figure 30). Les rats Kao14 ingèrent 5,7 % de kaolinite dans la fraction totale solide quotidienne (Figure 31) (Tableau 1-6).

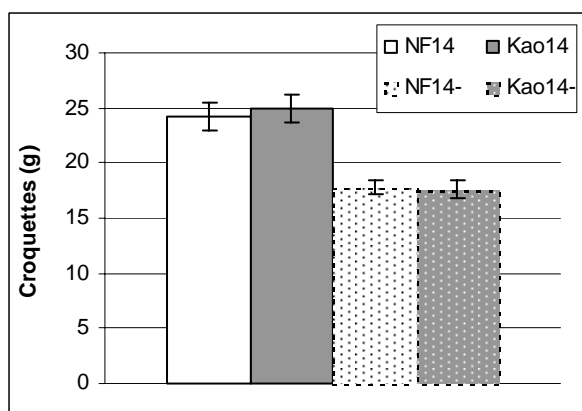


Figure 30. Consommation de croquettes des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

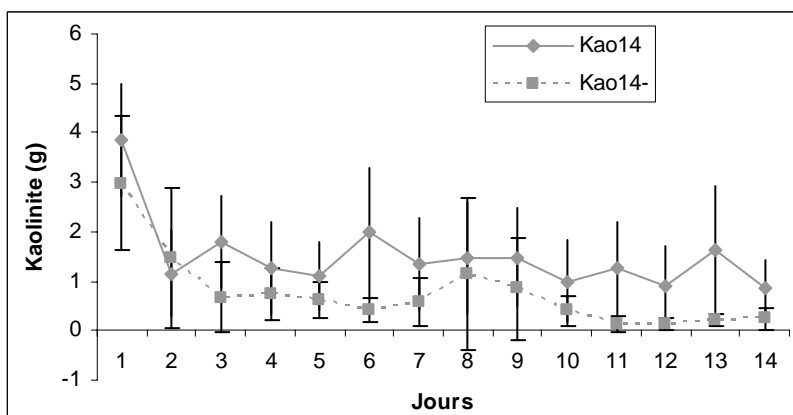


Figure 31. Consommation de kaolinite des rats Kao14 et Kao14-.

2) Animaux restreints

Les pertes de masse des rats NF14(-) et Kao14(-) sont similaires sur l'ensemble des 14 jours de complémentation (Figure 29). Fixées par le protocole, les consommations en croquettes ne sont pas différentes (Figure 30). Enfin, les rats Kao14(-) ingèrent 4,1 % de kaolinite dans la fraction totale solide quotidienne, avec une diminution de 50 % par rapport aux quantités d'argile ingérées par les animaux Kao14 (Figure 31) (Tableau 1-6).

Les masses corporelles des rats NF14(-) et Kao14(-) présentent une diminution significative et tendent à revenir à la masse d'avant restriction vers la fin de la période de 14 jours (Figure 29). Les masses corporelles des rats NF14(-) du premier et du sixième jour sont différentes entre elles ainsi que les masses des premier et huitième jours (test de Kruskal-Wallis). De la même façon, les masses corporelles des rats Kao14(-) du premier et du quatrième jour sont différentes entre elles ainsi que les masses des premier et sixième jours (test de Kruskal-Wallis). Les masses corporelles des rats NF14(-) et Kao14(-) cessent de diminuer à partir du sixième jour.

6.2. Composition corporelle

Après complémentation lors de la réalimentation, les résultats obtenus pour les rats RéaKao1 et RéaKao2 sont similaires. Les données sont ainsi rassemblées dans un groupe nommé RéaKao. Les carcasses des rats RéaNF- ont des pourcentages en eau inférieurs à ceux des rats RéaKao (Figure 32) (Tableau 2-1).

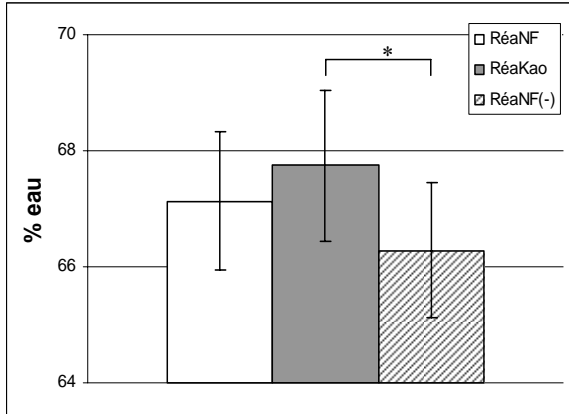


Figure 32. Pourcentage en eau des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.

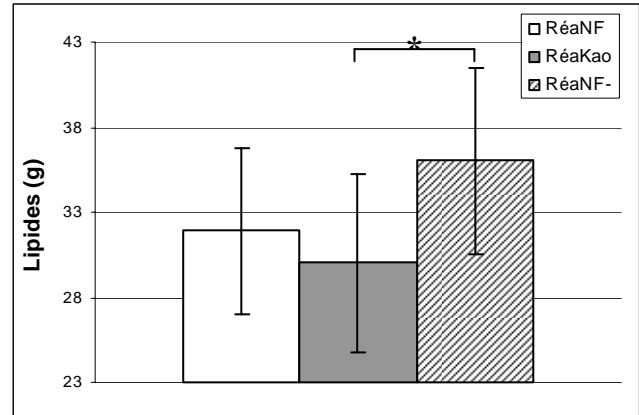


Figure 33. Masses lipidiques RéaNF, RéaKao et RéaNF-.

Les rats RéaNF et RéaKao ont des masses lipidiques non différentes, mais celles des rats RéaNF(-) sont significativement supérieures de 11,7 % à celles des rats RéaKao (Figure 33). Par ailleurs, les masses minérales des rats RéaNF(-) sont plus faibles de 11,6 % comparées à celles des rats RéaKao (Figure 34) (Tableau 2-1).

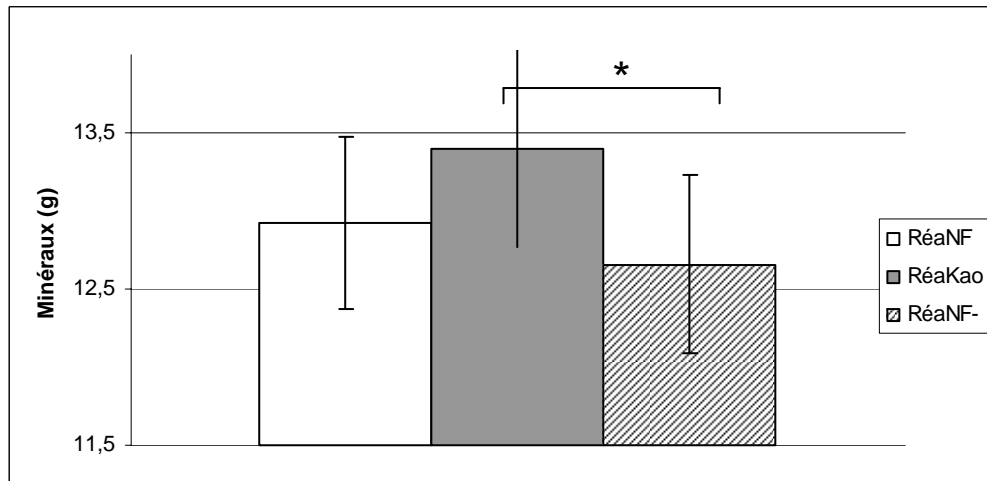


Figure 34. Masses minérales RéaNF, RéaKao et Réa NF-.

7. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

7.1. Observations en microscopie électronique à balayage

Des échantillons témoins de kaolinite et de montmorillonite brutes, non ingérés, ont été observés par ESEM/CSEM/EDX pour caractériser leurs morphologies et spécificités initiales. Ces observations sont insérées dans les parties relatives aux différents régimes expérimentaux traités.

A. Complémentation à long terme en kaolinite

Etude morphologique en mode ESEM : Les particules de kaolinite représentatives de la poudre commerciale brute non ingérée ont des formes subhexagonales avec des bordures rectilignes (Figure 35A). Les échantillons de jéjunum des rats Kao28 montrent la présence de nombreux amas de particules recouvrant la paroi intestinale (Figure 35B), situés préférentiellement au sommet des villosités intestinales (Figure 35C) et sur leurs faces (Figure 35D). Les rats Kao7 montrent une distribution identique. Les particules de kaolinite contenues dans le mucus recouvrant les villosités intestinales des rats Kao28 semblent légèrement altérées et disjointes avec des bordures moins rectilignes (Figure 35E). Ces particules sont parfois étroitement associées à des grains similaires aux grains d'amidon hydrolysés par action d'enzymes, les amylases, comme décrits par Harbers (1975) (Figure 35F).

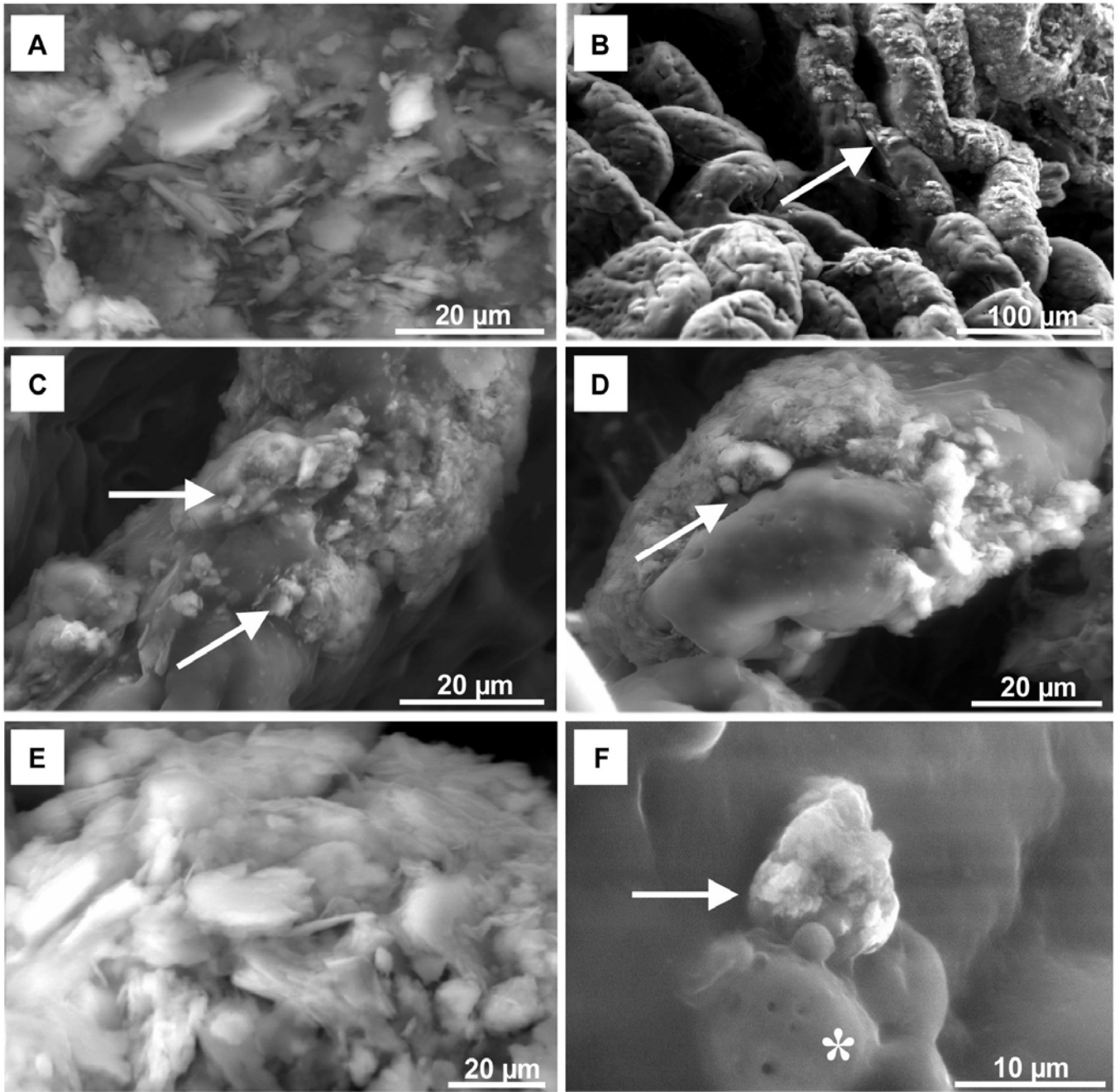


Figure 35. Kaolinite témoin et échantillons de jéjunum des rats Kao28 observés par ESEM. (A) Kaolinite témoin non ingérée formant un amas hétérogranulaire de plaquettes rigides. (B) Villosités intestinales avec des dépôts diffus de kaolinite (flèche) sur les sommets. (C et D) Particules de kaolinite (flèches) réparties sur le sommet et les faces d'une villosité. (E) Détail des particules de kaolinite imprégnées de mucus et disjointes. (F) Grains d'amidon hydrolysés (astérisque) au contact de particules de kaolinite (flèche).

Etude chimique en mode ESEM/EDX : Des analyses EDX sur les blocs témoins de kaolinite montrent des pics de silicium et d'aluminium d'intensité similaire (Figure 36).

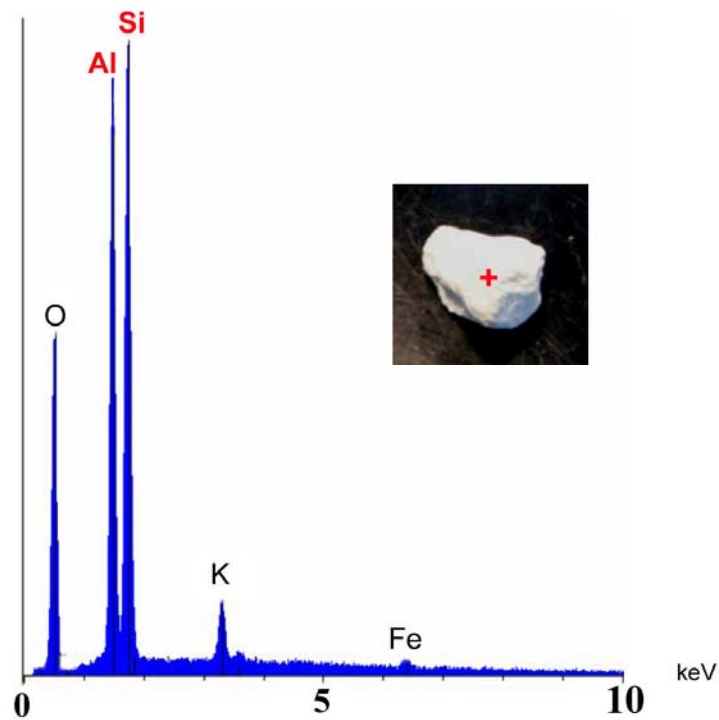


Figure 36. Analyses ESEM/EDX sur un échantillon de kaolinite témoin.

Les analyses chimiques EDX faites directement sur des amas de kaolinite fixés sur la surface des villosités intestinales de rats Kao28 montrent soit la présence des raies Al et Si de la kaolinite au milieu des éléments du mucus (composition : C, H, N, O, P, S) (spot, Figure 37A), soit la présence diffuse d'aluminium dans le mucus environnant et le caractère plus siliceux des agrégats résiduels (carte 2D, Figure 37B).

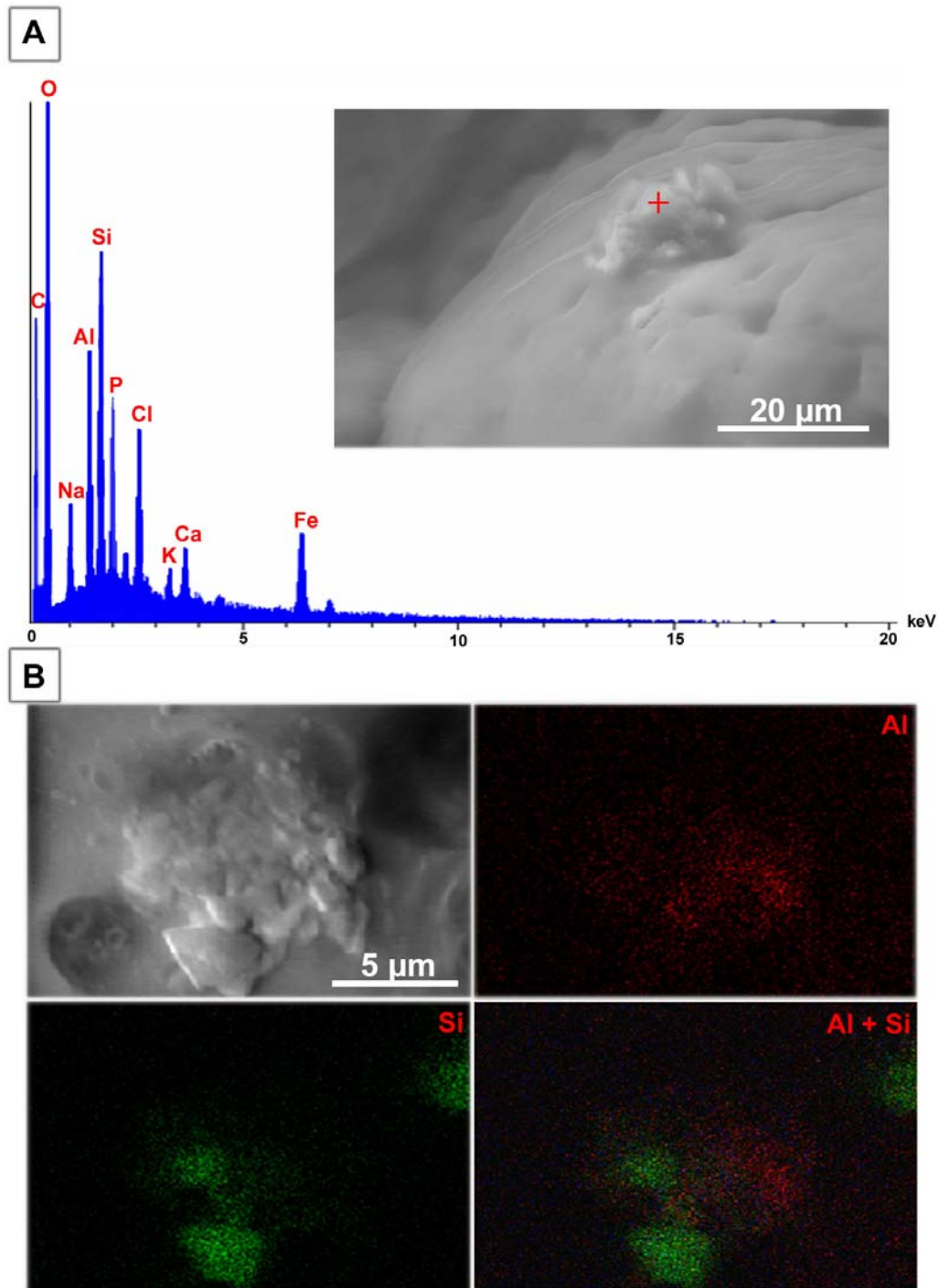


Figure 37. Analyses ESEM/EDX sur des échantillons de jéjunum des rats Kao28. (A) Analyse spectrale d'un amas de particules de kaolinite imprégnées de mucus avec pics de silicium et d'aluminium. (B) Cartographies chimiques 2D montrant la répartition spatiale distincte entre l'aluminium et le silicium.

Des analyses EDX complémentaires faites à l'intérieur d'une villosité intestinale de rats Kao28 à partir de fragments inclus dans la résine et coupés au microtome (*block-faces*), indiquent la présence d'aluminium et de silicium dans la bordure en brosse mais également dans des parties plus internes de la muqueuse intestinale (Figure 38).

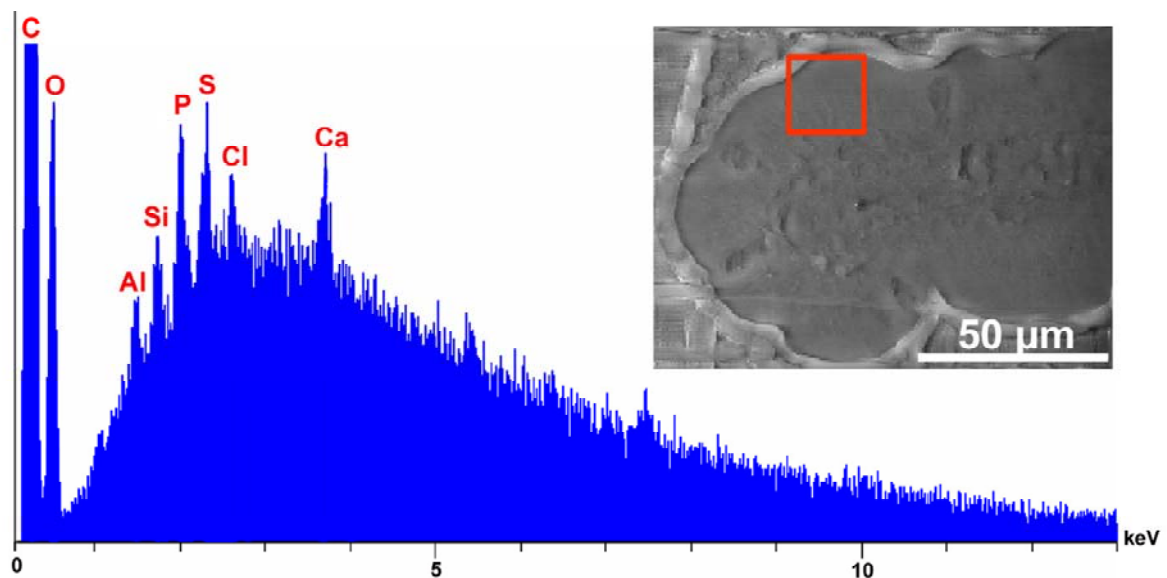


Figure 38. Analyses ESEM/EDX sur des échantillons de jéjunum des rats Kao28. Analyse spectrale de villosités intestinales contenues dans un échantillon de résine « block-face ».

Études morphologiques en CSEM : Les particules de kaolinite témoins ont une structure hexagonale typique (Figure 39A). Les particules de kaolinite non ingérées mais traitées avec la méthode de déshydratation réalisée pour observer les tissus frais présentent une érosion des bordures et de nombreux sous-grains (Figure 39B). Les échantillons d'intestin présentent un résidu de particules de kaolinite déposées aux sommets des villosités (Figure 39C). Par rapport aux échantillons standard non ingérés, les lamelles de kaolinite sont nettement modifiées avec des bordures irrégulières et la présence de sous grains (Figure 39D). Les particules au contact des microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes sont très altérées (Figure 39E et 39F).

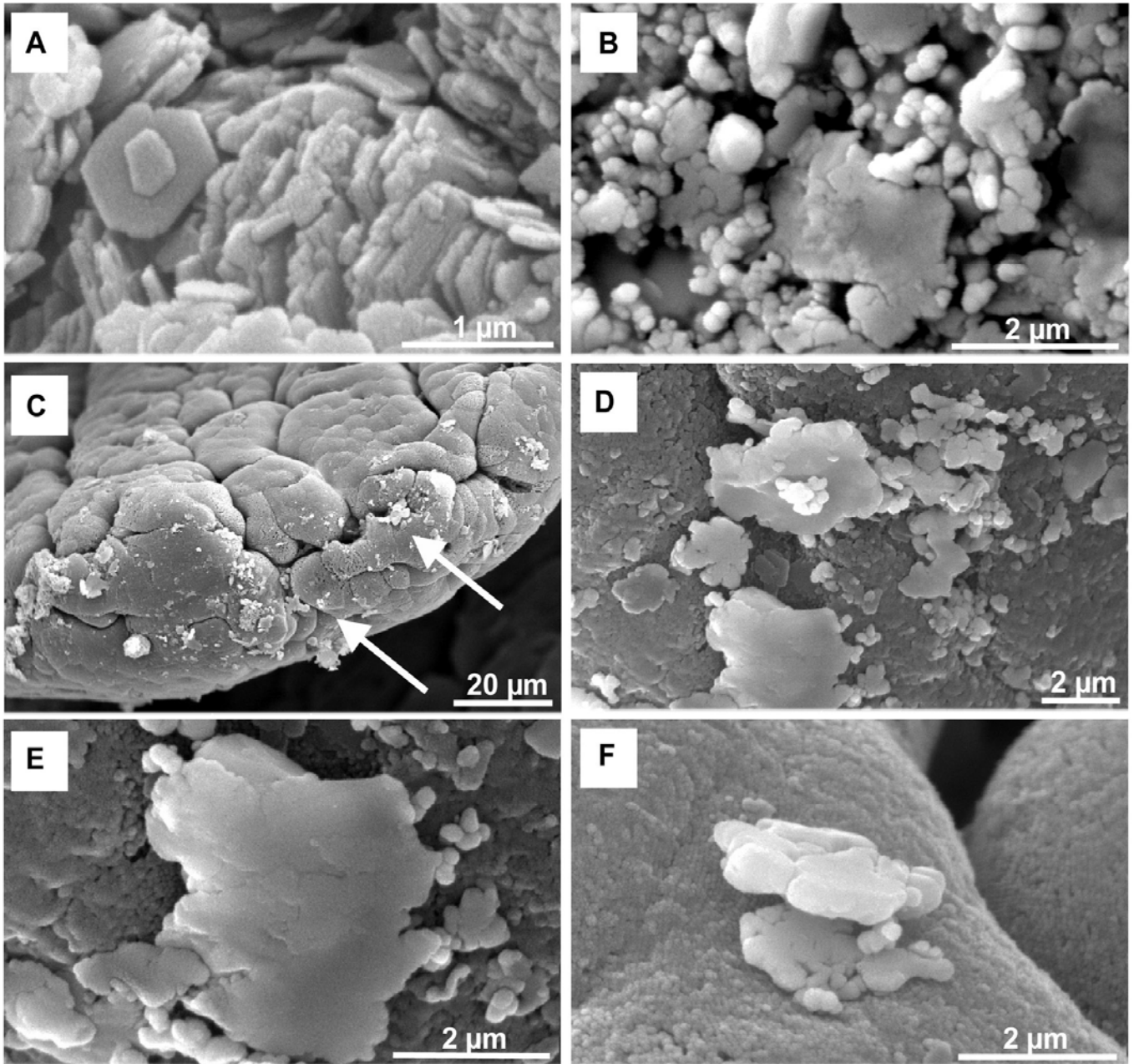


Figure 39. Images CSEM de particules de kaolinite témoin et d'échantillons de jéjunum des rats Kao28. (A) Particules de kaolinite non ingérées aux contours hexagonaux caractéristiques. (B) Particules de kaolinite non ingérées soumises au traitement appliqué aux fragments d'intestin, avec développement de nombreux sous-grains. (C) Particules résiduelles de kaolinite (flèches) visibles aux sommets des villosités. (D, E, F) Détail sur des particules de kaolinite ingérées en contact avec la bordure en brosse des entérocytes.

B. Complémentation à long terme en montmorillonite

Etude morphologique en ESEM : Les particules de montmorillonite présentent des structures caractéristiques de cette argile (Figure 40A) avec des feuillets disposés en lamelles souples (Figure 40B).

Après ingestion, les particules de montmorillonite sont retrouvées principalement au sommet des villosités sous la couche de mucus (Figure 40C) et parfois dans des amas localisés sur les faces des villosités (Figure 40D). Enfin, des amas importants sont également présents à la base de certaines villosités (Figure 40E).

De même que chez les rats ayant ingéré de la kaolinite, des grains d'amidons sont retrouvés en contact direct avec des particules de montmorillonite (Figure 40F).

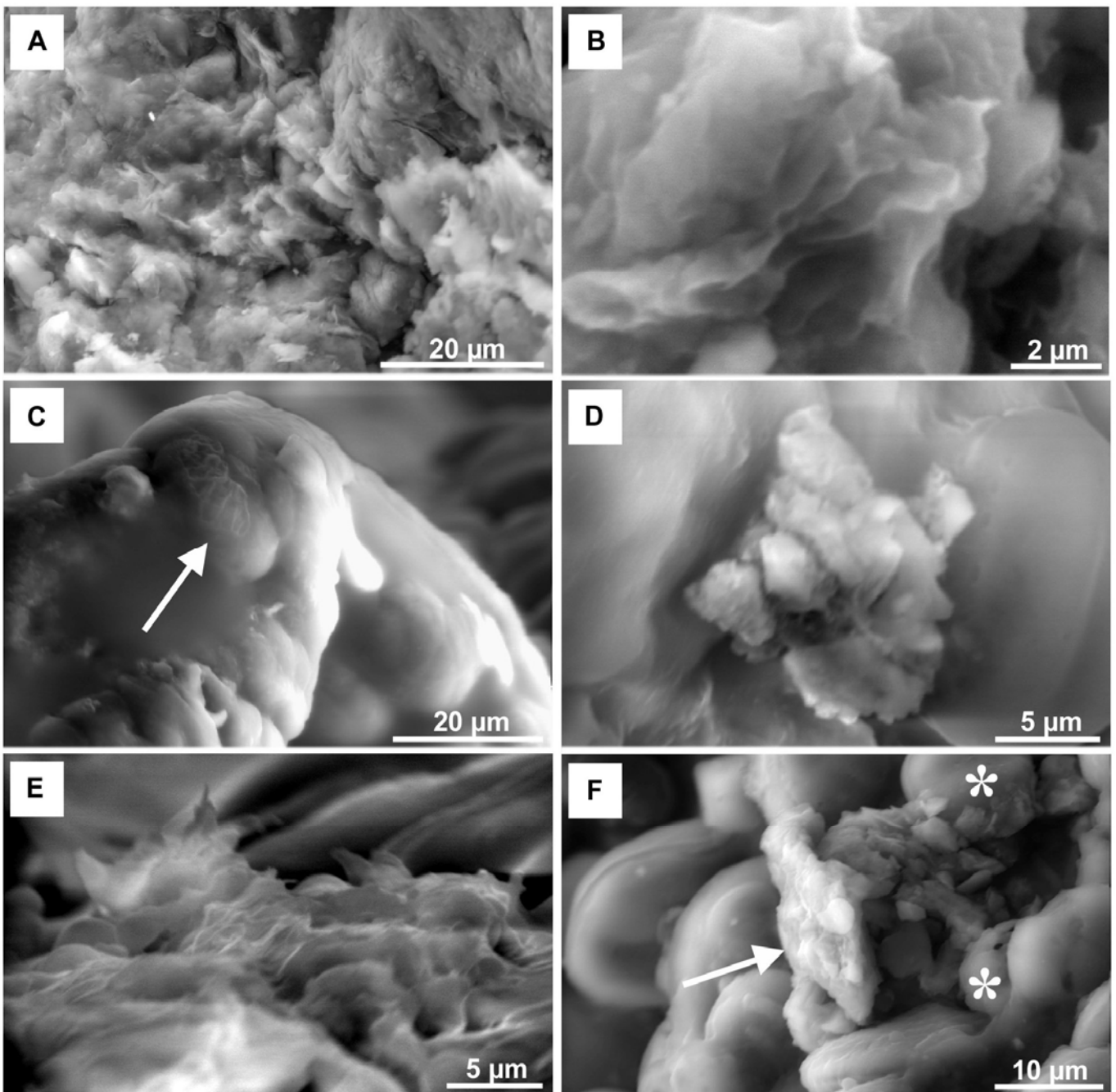


Figure 40. Images ESEM d'échantillons de jéjunum des rats MMT28. (A et B) Particules de montmorillonite témoins non ingérées. (C) Particules de montmorillonite (flèche) dans le mucus des sommets des villosités. (D) Ensemble de particules de montmorillonite sur les faces des villosités. (E) Amas importants de particules de montmorillonite présents à la base de villosités. (F) Grains d'amidon hydrolysés (astérisques) en contact avec des particules de montmorillonite (flèche).

Etude chimique en ESEM/EDX : Des analyses EDX sur les blocs témoins de montmorillonite mettent en évidence des pics de silicium plus intenses que ceux d'aluminium (Figure 41).

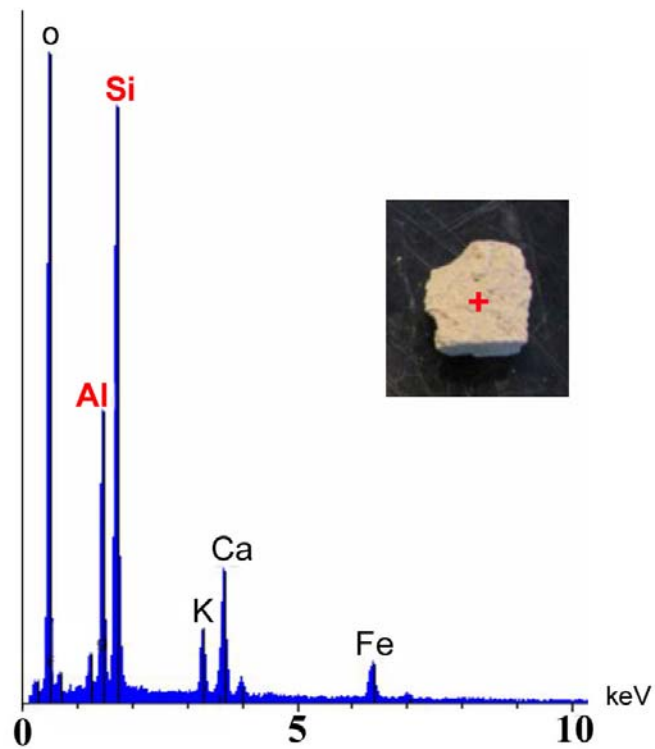


Figure 41. Analyses ESEM/EDX sur un échantillon de montmorillonite témoin..

Les analyses chimiques EDX obtenues directement sur les surfaces planes des villosités intestinales des rats MMT28 confirment parmi les nombreux éléments constitutifs du mucus, la présence de Al et Si associée aux particules de montmorillonite encore bien conservées (Figure 42A). À certains endroits, l'aluminium semble avoir diffusé préférentiellement dans la couche de mucus recouvrant la surface des villosités alors que le silicium semble concentré dans des amas argileux résiduels (Figure 42B).

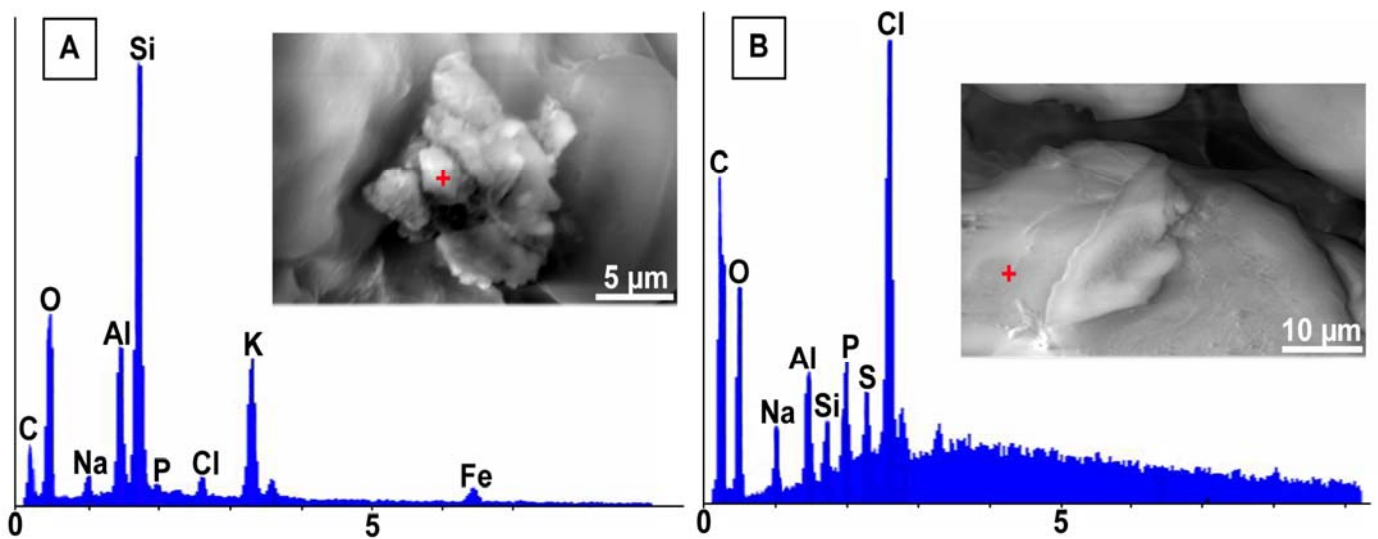


Figure 42. Analyses ESEM/EDX d'échantillons de jéjunum des rats MMT28. (A) Analyse spectrale d'une particule de montmorillonite. (B) Analyse spectrale du mucus environnant une particule de montmorillonite.

Etude morphologique en CSEM : L'observation des montmorillonites témoins est difficile et assez peu adaptée, mais montre néanmoins des amas microporeux et hétérogranulaires (Figure 43A).

Les échantillons d'intestin montrent quelques paquets de particules de montmorillonite observées principalement sur les sommets des villosités (Figure 43B et 43C). Il est possible de visualiser par endroits des structures en feuillets caractéristiques de la montmorillonite tassés à cause de la déshydratation liée à la préparation (Figure 43D). Les résidus de particules de montmorillonite sont retrouvés en contact avec les microvillosités (Figure 43E) et des grains d'amidons hydrolysés (Figure 43F).

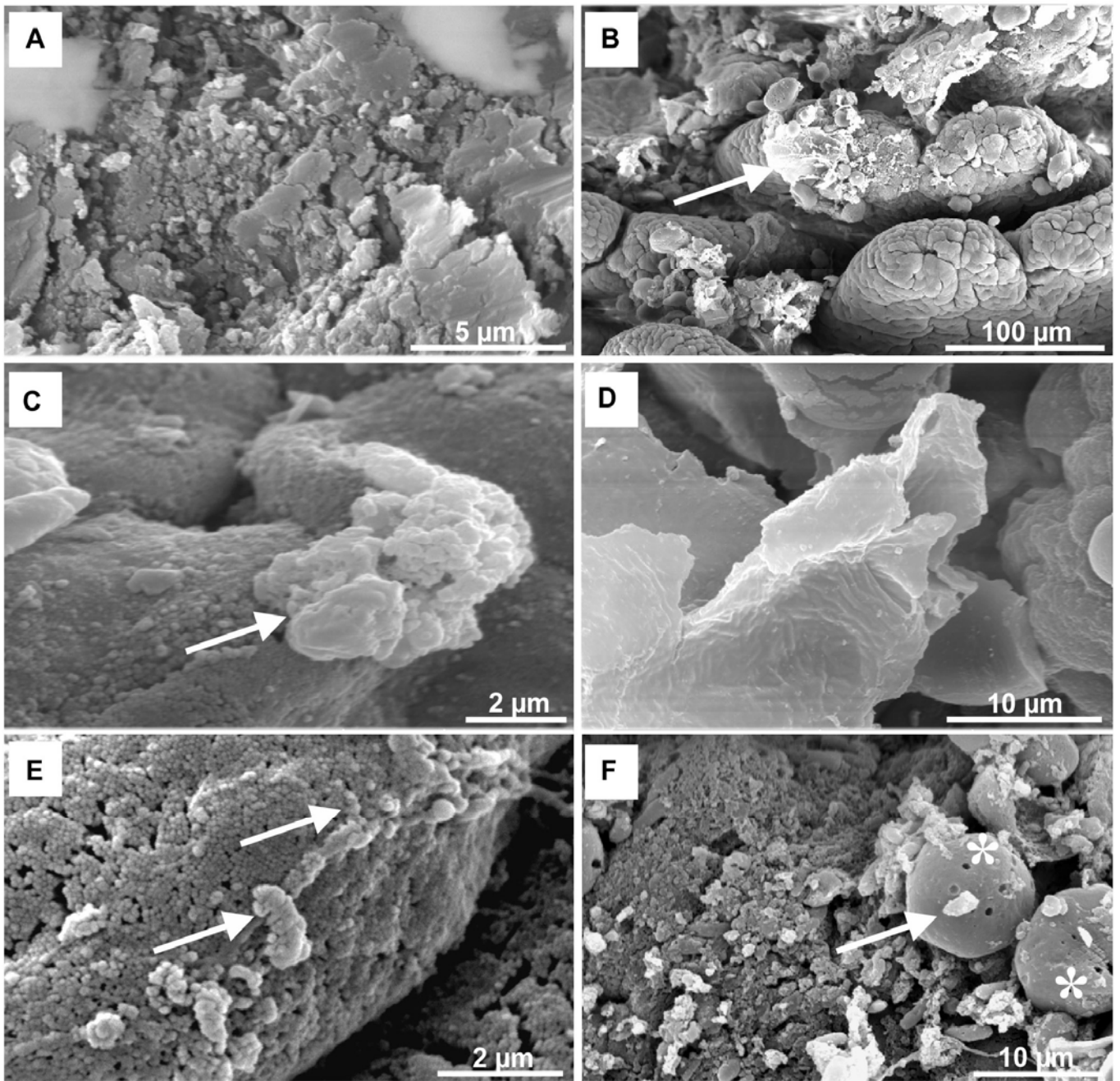


Figure 43. Images CSEM d'échantillons de jéjunum des rats MMT28. (A) Particules de montmorillonite témoins. (B et C) Particules de montmorillonite (flèches) visibles au sommet des villosités. (D) Structures feuilletées résiduelles des particules déshydratées. (E) Particules de montmorillonite (flèches) en contact avec les microvillosités. (F) Grains d'amidon hydrolysés (astérisques) en contact avec des particules de montmorillonite (flèche).

C. Remarque

Les observations en mode ESEM (sous faible vide) ont permis de visualiser un phénomène dynamique systématique, classiquement observé lors de la mise sous vide de corps riches en liquides. Tout de suite après la mise en place, dans la chambre du microscope, d'un fragment intestinal frais (autant chez des rats Kao28 que MMT28), il se forme de nombreuses gouttelettes fluides observables au sommet des villosités, révélant la présence d'une matière fluide sous la membrane apicale des entérocytes du sommet des villosités des rats Kao28 (Figure 44A) et MMT28 (Figure 44B).

Les analyses ESEM/EDX de ces gouttelettes de l'échantillon montrent un pic massif de carbone (Figure 44C).

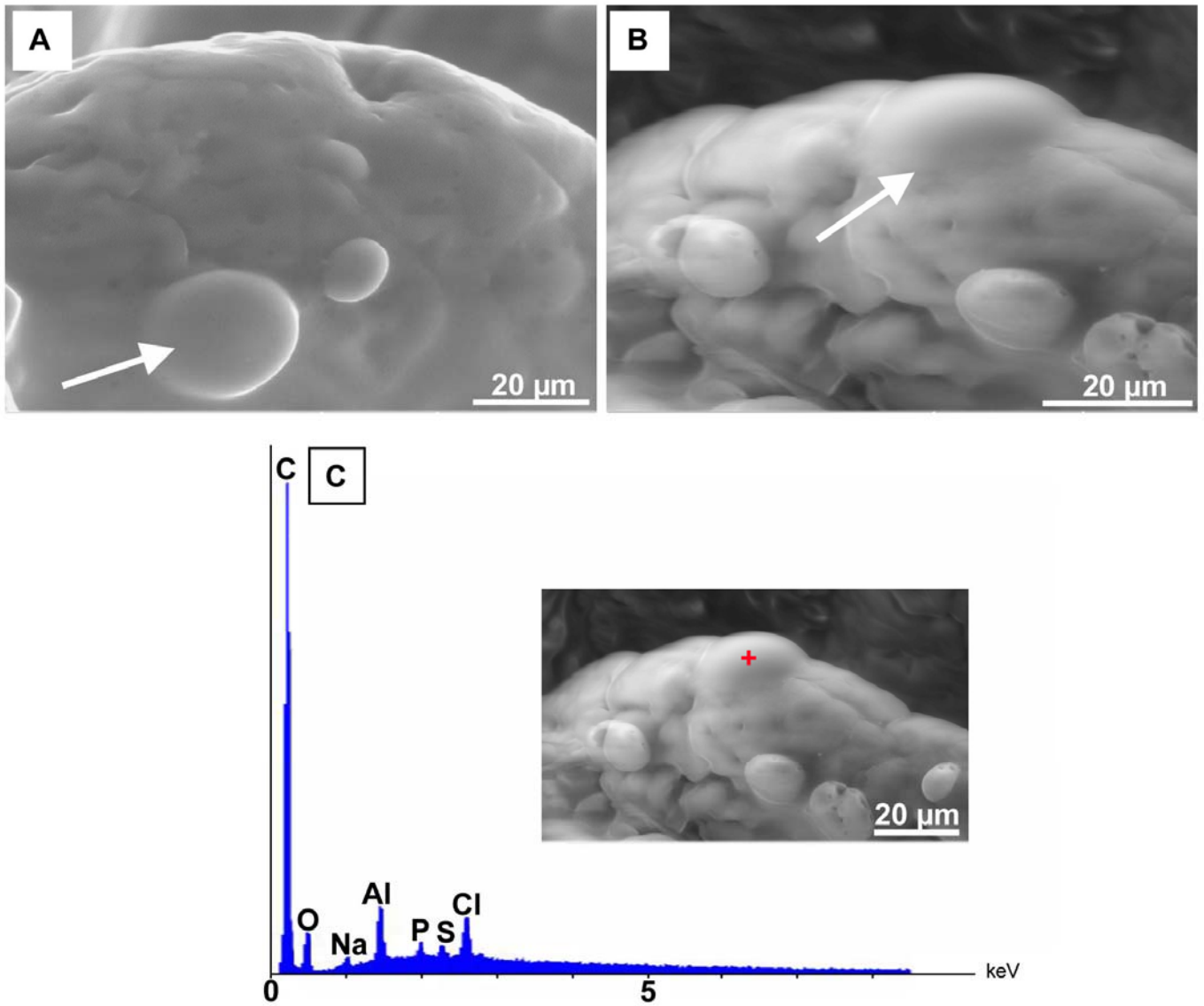


Figure 44. Images ESEM d'échantillons de jéjunum des rats Kao28 et MMT28. Analyses ESEM/EDX.

(A) Villosité de rat Kao28 avec gouttelette extrudée (flèche). (B) Villosité de rat MMT28 avec gouttelette extrudée (flèche). (C) Analyse spectrale d'une gouttelette présente sur une villosité de rat MMT28.

D. Complémentation en kaolinite durant le jeûne

Etude morphologique en ESEM : L'observation ESEM des échantillons d'intestin des rats Kao7+P3Kao montre les particules de kaolinite fixées dans le mucus des villosités (Figure 45A, 45B et 45C), sans interférence liée à la présence de nourriture dans la lumière intestinale.

Comme chez les rats Kao28, les particules de kaolinite sont engluées dans le mucus (Figure 45D), recouvrant les villosités intestinales avec, par endroits, des agrégats épars plus importants (Figure 45E et 45F). Les particules de kaolinite observées sur les échantillons d'intestin des rats Kao7+P3Kao montrent également des signes d'altérations.

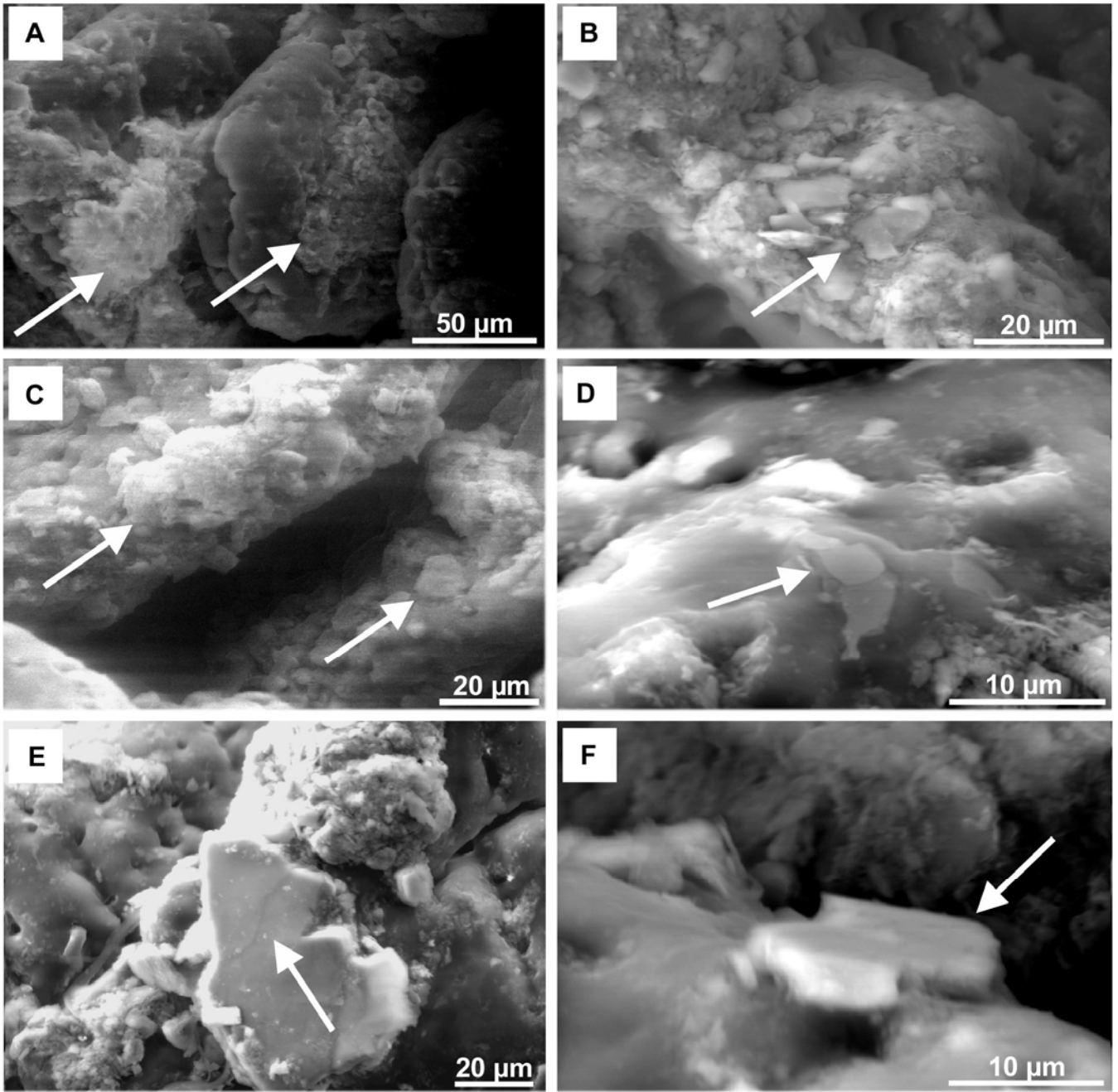


Figure 45. Images ESEM d'échantillons de jéjunum des rats Kao7+P3Kao. (A) Villosités recouvertes sur leurs faces et leurs sommets par des particules de kaolinite (flèches). (B et C) Particules de kaolinite (flèche) aux sommets des villosités. (D) Particules de kaolinite (flèche) incluses dans le mucus. (E) Fragment de kaolinite (flèche) au contact d'une villosité. (F) Particule de kaolinite recouverte de mucus (flèche).

Etude chimique en ESEM/EDX : L'observation ESEM des échantillons d'intestin des rats Kao7+P3Kao montre des particules de kaolinite présentes dans le chyme intestinal récupéré dans la portion terminale de l'iléon au moment de la dissection.

Comparés aux analyses faites sur le chyme des rats témoins, les analyses EDX montrent les traces chimiques de particules de kaolinite, avec des pics caractéristiques de l'aluminium et du silicium (Figure 46).

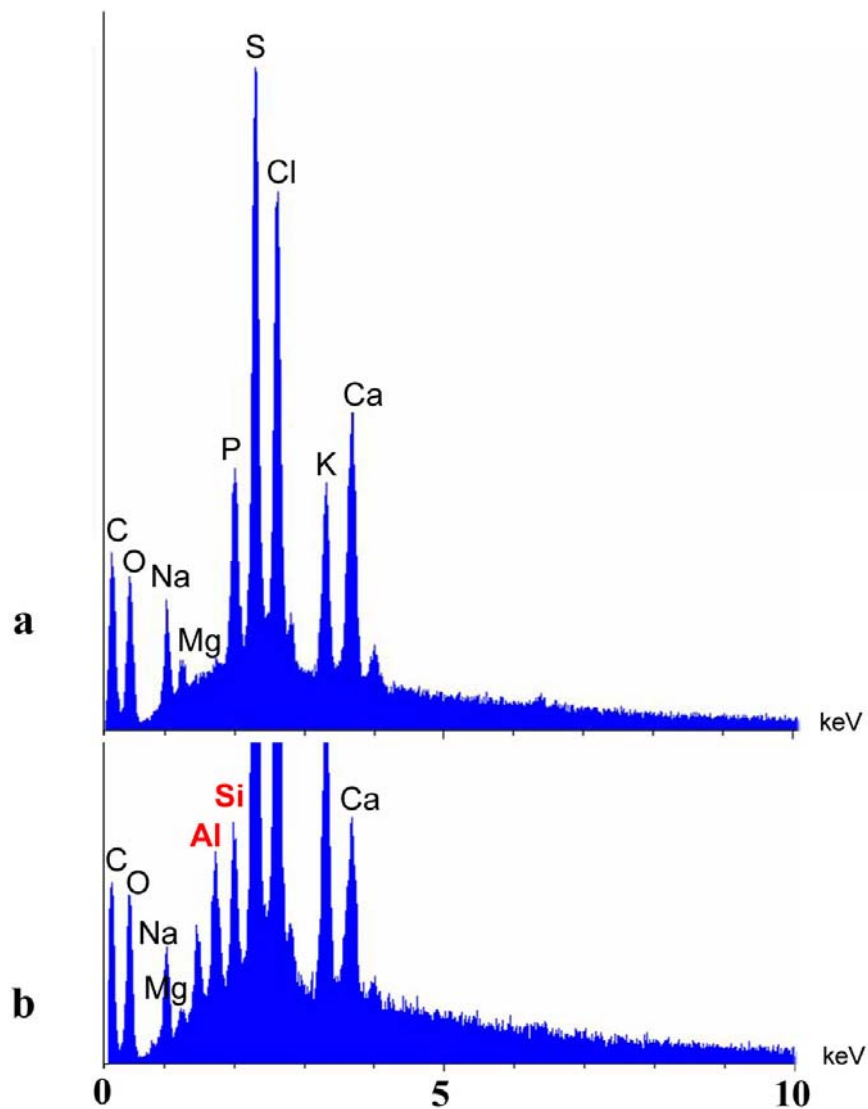


Figure 46. Analyses ESEM/EDX de chyme intestinal.
(a) Rat NF+P3. (b) Rat Kao7+P3Kao.

Observations en CSEM : Les particules de kaolinite témoins de la poudre commerciale utilisée présentent des structures hexagonales caractéristiques (Figure 47A), avec des bordures linéaires (Figure 47B). Les particules observées dans les fèces et non soumises au traitement de déshydratation présentent de légères altérations avec perte des structures hexagonales anguleuses (Figure 47C) et acquisition de bords émoussés et indentés (Figure 47D).

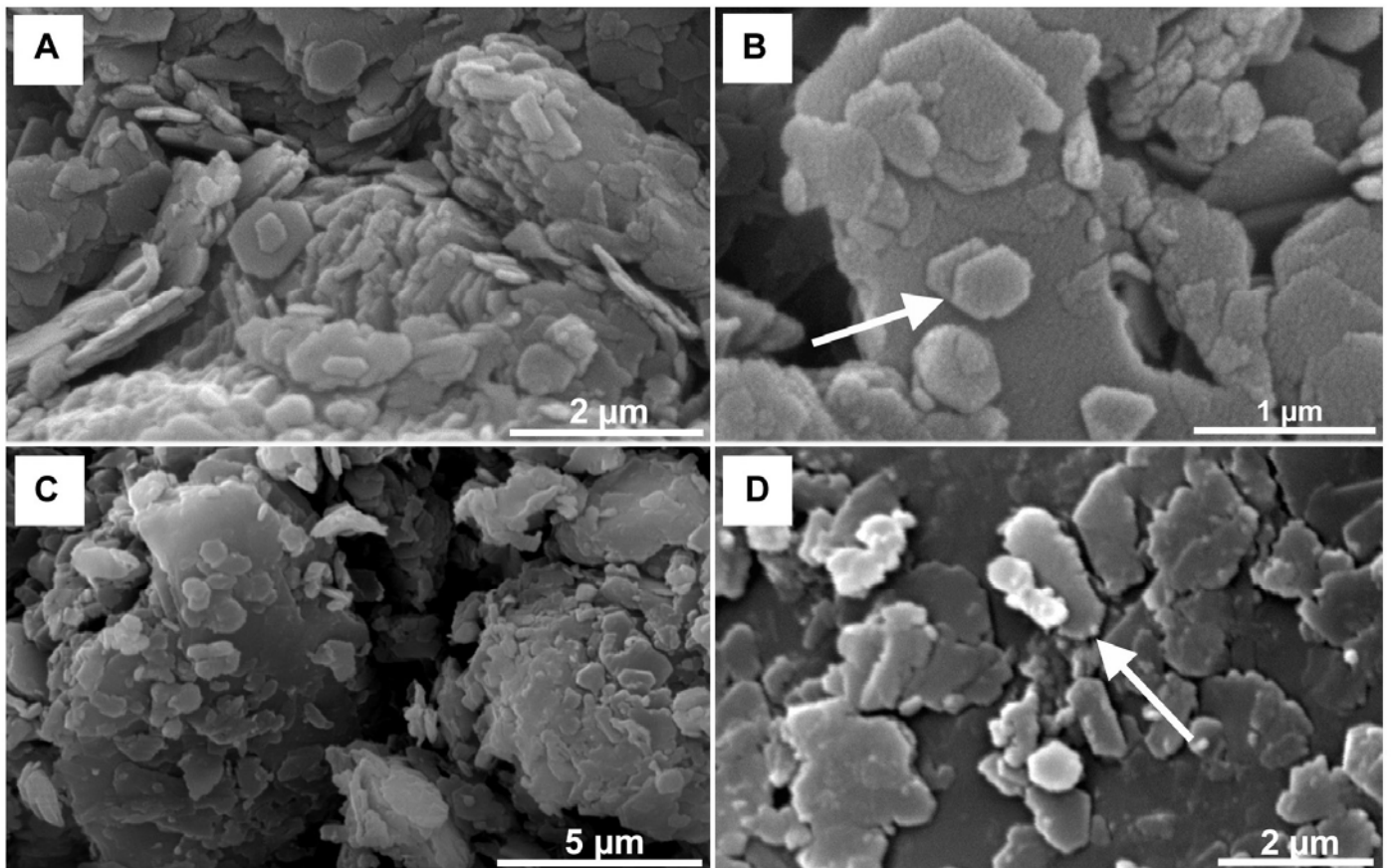


Figure 47. Images CSEM de fèces de rats Kao7+P3Kao.
(A et B) Particules de kaolinite témoin. (C et D) Particules observées dans les fèces.

7.2. Observations en microscopie photonique et microscopie électronique par transmission

A. Données histologiques

1) Complémentation à long terme

a) NF14 et NF28

En MP, les villosités des rats témoins se présentent sous la forme d'un épithélium monostratifié, entourant un chorion fin (Figure 48A).

En MET, des cellules contenant des lipides en plus ou moins grandes quantités sont observées au sommet des villosités (Figure 48B), avec présence de gouttelettes lipidiques au niveau du cytoplasme apical des entérocytes (Figure 48C). Ces gouttelettes fusionnent pour former des gouttes lipidiques au dessus du noyau (Figure 48D). Des gouttelettes sont observées au niveau des saccules de l'appareil de Golgi et du RER (Figure 48E). Enfin, la présence de corps multilamellaires est observée au dessus du noyau (Figure 48F).

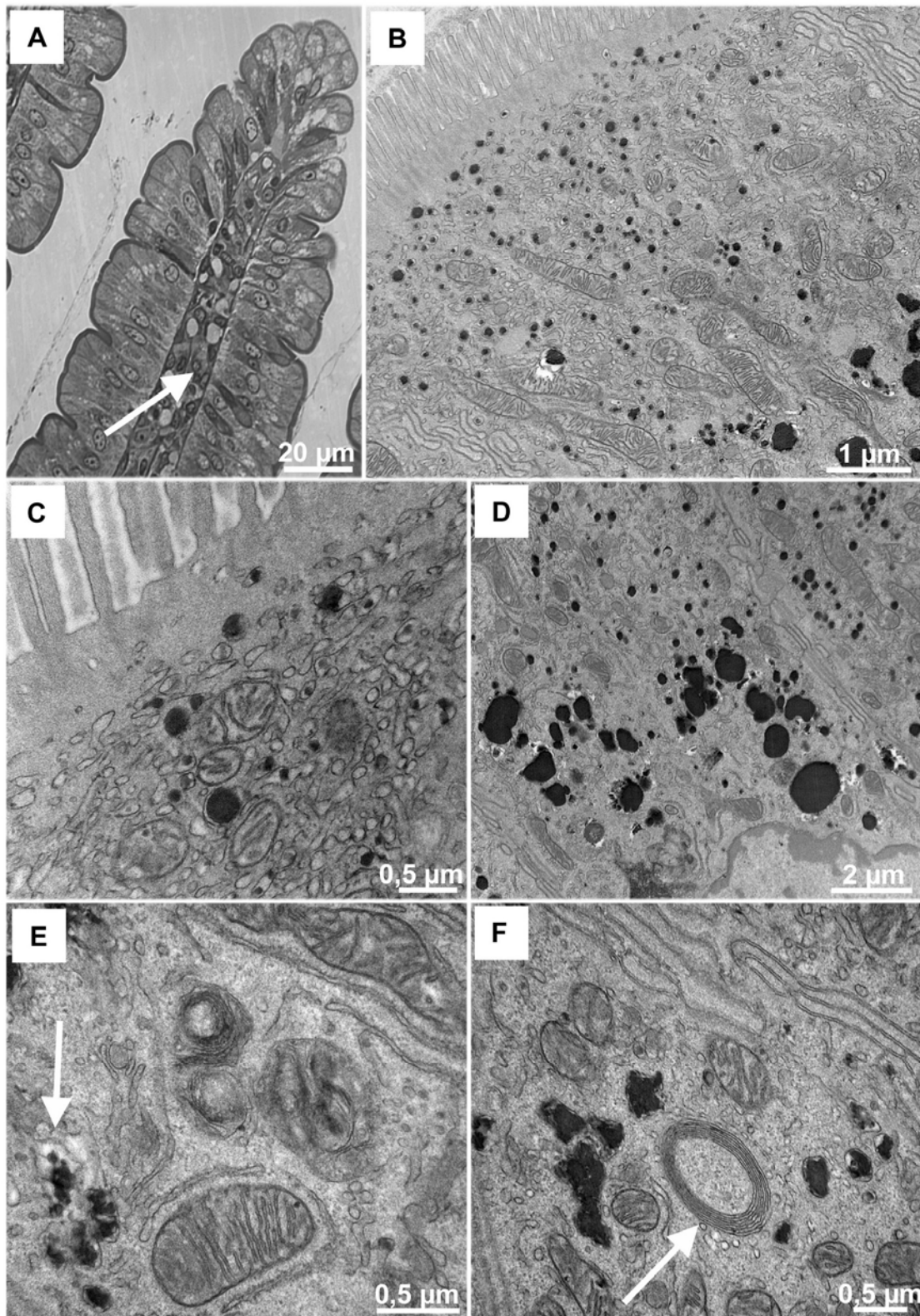


Figure 48. NF14 et NF28 (1).

(A) Villosité composée d'un épithélium monostratifié entourant un chorion (flèche). (B) Gouttelettes lipidiques présentes dans un entérocyte. (C) Gouttelettes lipidiques sous la bordure en brosse. (D) Gouttelettes lipidiques fusionnant au dessus du noyau. (E) Gouttelettes lipidiques pénétrant dans un système de saccules (flèche) provenant de l'appareil de Golgi. (F) Corps multilamellaires (flèche) au dessus du noyau. (A : MP, protocole 1 ; B, C, D, E, F : MET, protocole 3 ou 4).

Ces gouttes lipidiques migrent vers les membranes latérales et fusionnent entre elles pour déverser leur contenu dans les espaces intercellulaires (Figure 49A). Des fragments membranaires sont observés dans ces espaces (Figure 49A). Ces lipides migrent vers la base de la cellule et passent au travers des espaces de Grünhagen et de la *lamina propria* avant de pénétrer dans le chylifère (Figures 49B, 49C et 49D).

Des saccules provenant du RER ou de l'appareil de Golgi entourent des gouttelettes lipidiques pour former des autophagosomes (= vacuoles autophagiques). Certaines mitochondries chargées en lipides peuvent aussi dégénérer en autophagosomes (Figure 49E). Après fusion avec les lysosomes cellulaires, la formation de phagolysosomes et de corps résiduels est visible (Figure 49F).

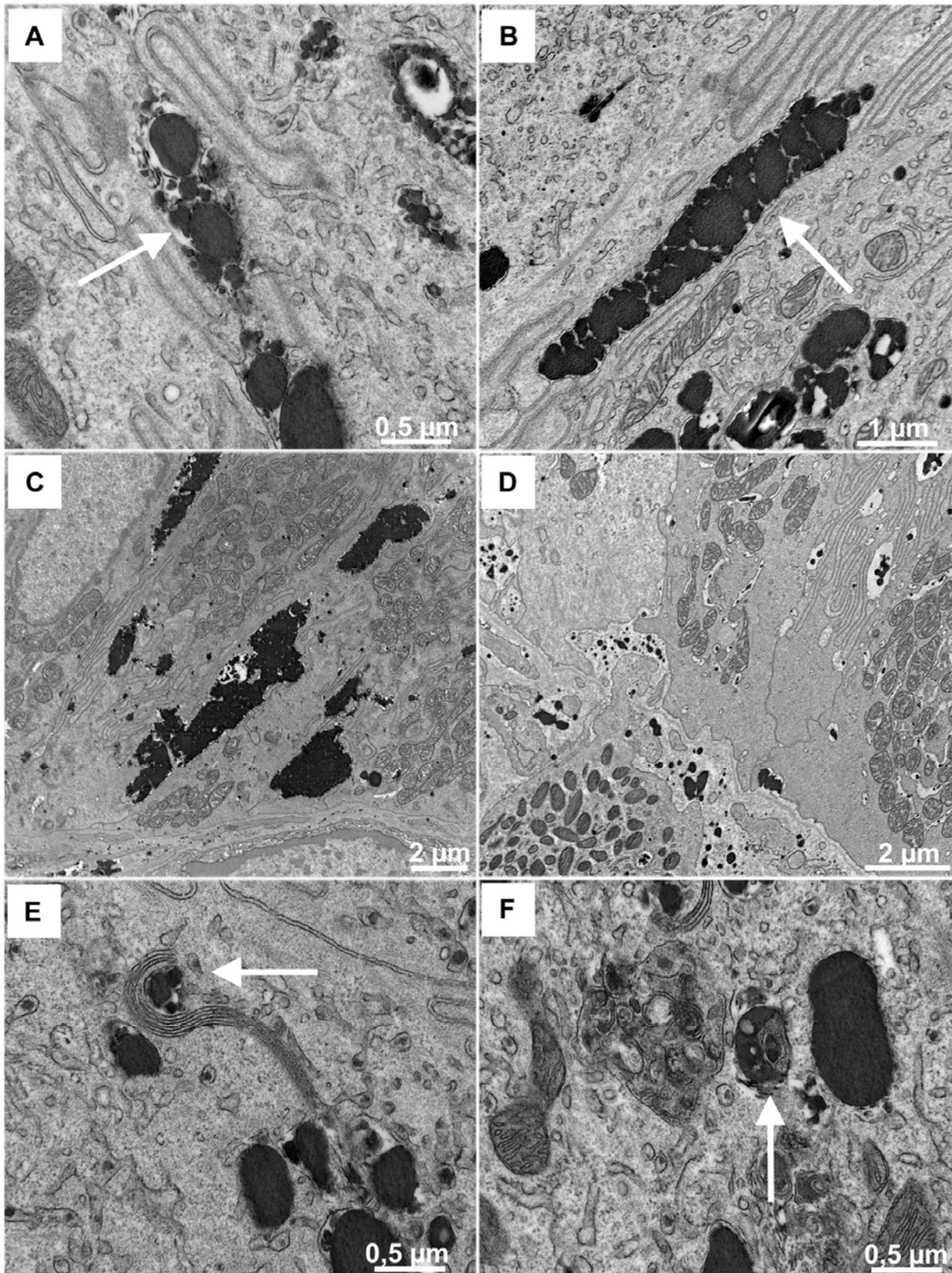


Figure 49. NF14 et NF28 (2)

(A) Gouttelettes lipidiques fusionnant avec les membranes latérales des entérocytes (flèche). (B et C) Lipides migrant dans les espaces intercellulaires jusqu'à la base de la cellule (flèche). (D) Lipides passant au travers de la *lamina propria* avant de pénétrer dans le chylifère. (E) Autophagosomes (= vacuoles autophagiques) en formation (flèche). (F) Corps résiduels en formation (flèche). (A, B, C, D, E, F : MET, protocole 3 ou 4).

b) Kao7, Kao14 et Kao28

En MP, les villosités des rats Kao14 et Kao28 contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques, au niveau des entérocytes du sommet, en moins grand nombre que chez les rats Kao7 (Figures 50A, 50B et 50C).

Les villosités des rats Kao28 sont plus larges que celles des rats NF28 et Kao7. Cet élargissement des villosités est principalement dû à l'élargissement des bases des entérocytes observé chez les rats Kao14 et Kao28 (Figures 50B, 50C et 50D). Ce phénomène est absent chez les animaux Kao7 (Figure 50A).

Les bases des entérocytes élargies en contact avec la *lamina propria* sont caractérisées en MET par un cytoplasme peu dense aux électrons, une absence d'organites et la présence au niveau apical d'une structure cytosquelettique (Figures 50E et 50F).

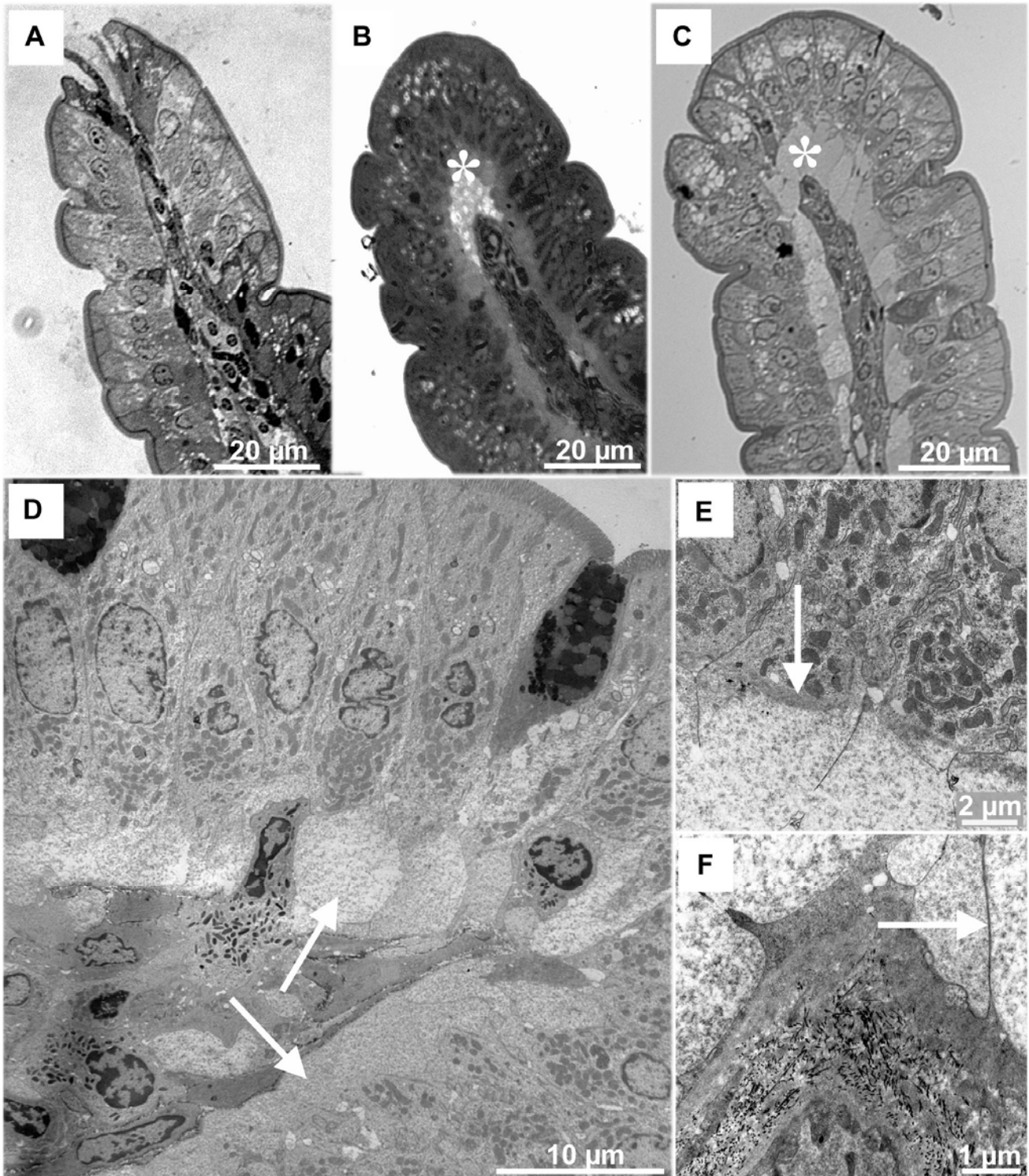


Figure 50. Kao7, Kao14 et Kao28 (1).

(A) Villosité de rat Kao7. (B) Villosité de rats Kao14 élargie au niveau de l'apex (astérisque). (C) Villosité de rat Kao28 élargie au niveau de l'apex (astérisque). (D) Entérocytes avec des espaces sous les entérocytes (Kao28, flèches). (E) Espaces séparés au niveau apical par une structure cytosquelettique (Kao28, flèche). (F) Membranes latérales souples et longues des bases élargies (Kao28, flèches) reliant les entérocytes à la *lamina propria*. (A, B, C: MP, protocole 1 ; D, E, F: MET, protocole 1).

Après 7 jours de complémentation, des lipides sont observés dans l'ensemble des cellules des sommets des villosités des rats Kao7 (Figure 51A). Les mêmes phénomènes décrits précédemment chez les NF14 et NF28 sont observés. Ceux-ci sont amplifiés après 14 et 28 jours de complémentation (Figures 51B et 51C).

D'autres phénomènes sont visibles tels que la réduction de taille des microvillosités qui constituent la bordure en brosse et l'augmentation du volume des espaces intercellulaires, élargis par le passage de nombreux lipides des cellules vers les espaces intercellulaires puis le chylifère central (Figure 51D). Des gouttelettes plus volumineuses de lipides sont présentes dans tous les entérocytes (Figure 51E), dans les espaces intercellulaires latéraux (Figures 51F et 51G) et dans les espaces intercellulaires basolatéraux ou espaces de Grünhagen (Figures 51H et 51I).

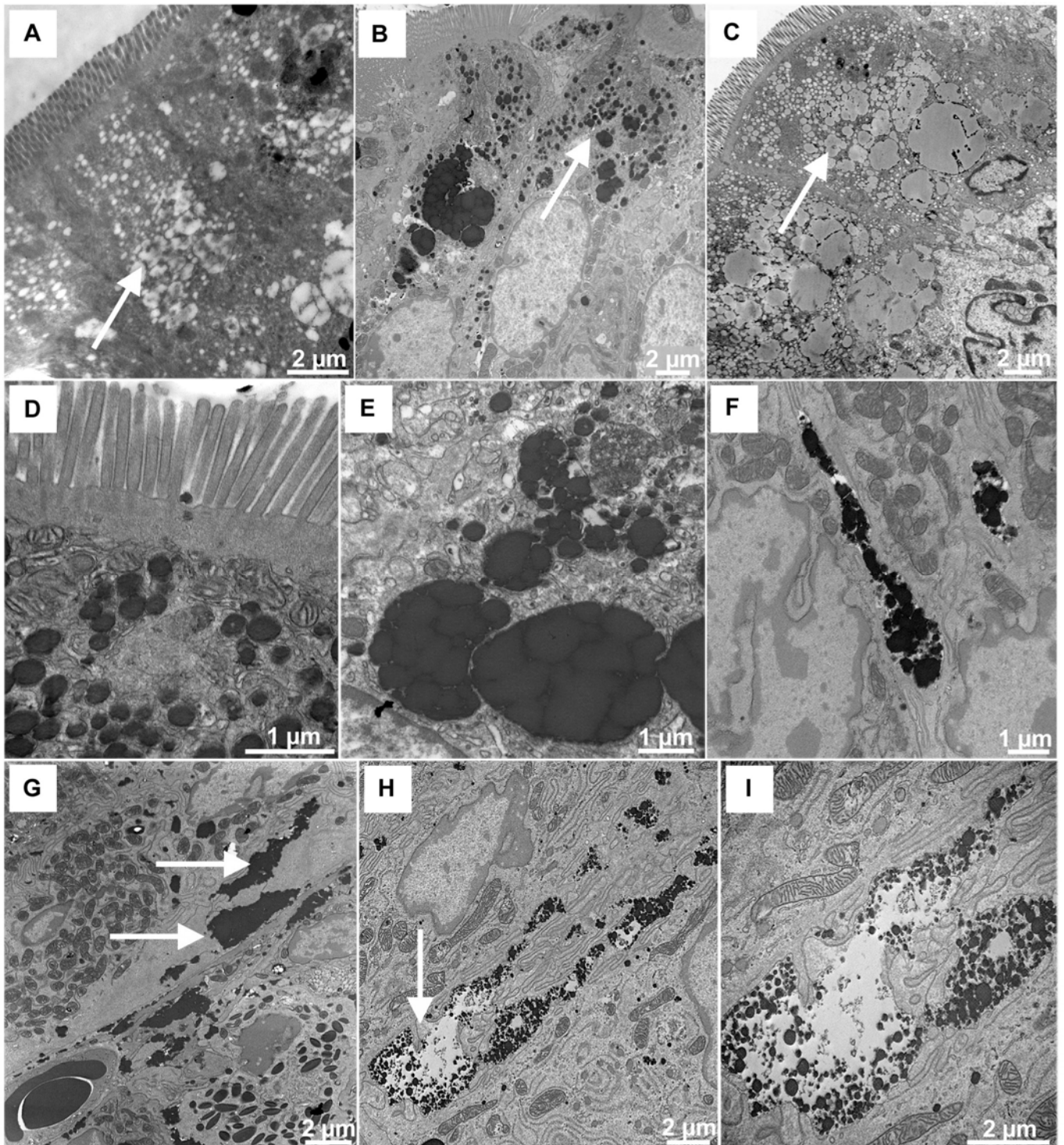


Figure 51. Kao7, Kao14 et Kao28 (2).

(A) Entérocytes de rats Kao7 avec des gouttelettes lipidiques (flèche). (B) Entérocytes de rats Kao14 avec des gouttelettes lipidiques (flèche). (C) Entérocytes de rats Kao28 avec des gouttelettes lipidiques (flèche). (D) Bordure en brosse de rat Kao14. (E) Gouttelettes lipidiques fusionnant au dessus du noyau (Kao14). (F et G) Lipides migrant dans les espaces intercellulaires puis atteignant de chylifère central (flèche) (Kao14). (H et I) Espaces de Grünhagen (flèche) débouchant sur le chylifère (Kao14). (A, C : MET, protocole 1 ; B, D, E, F, G, H, I: MET, protocole 3 ou 4).

Des saccules de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Figure 52A) et des mitochondries gorgés de lipides sont également observés (Figure 52B), avec de temps en temps des gouttelettes lipidiques dans les noyaux (Figure 52C).

L'encerclement des gouttelettes lipidiques par des saccules de l'appareil de Golgi (Figure 51D) conduit à la formation d'un nombre de lysosomes gorgés de lipides (Figure 52E) qui se transforment en vacuoles digestives (Figure 52F).

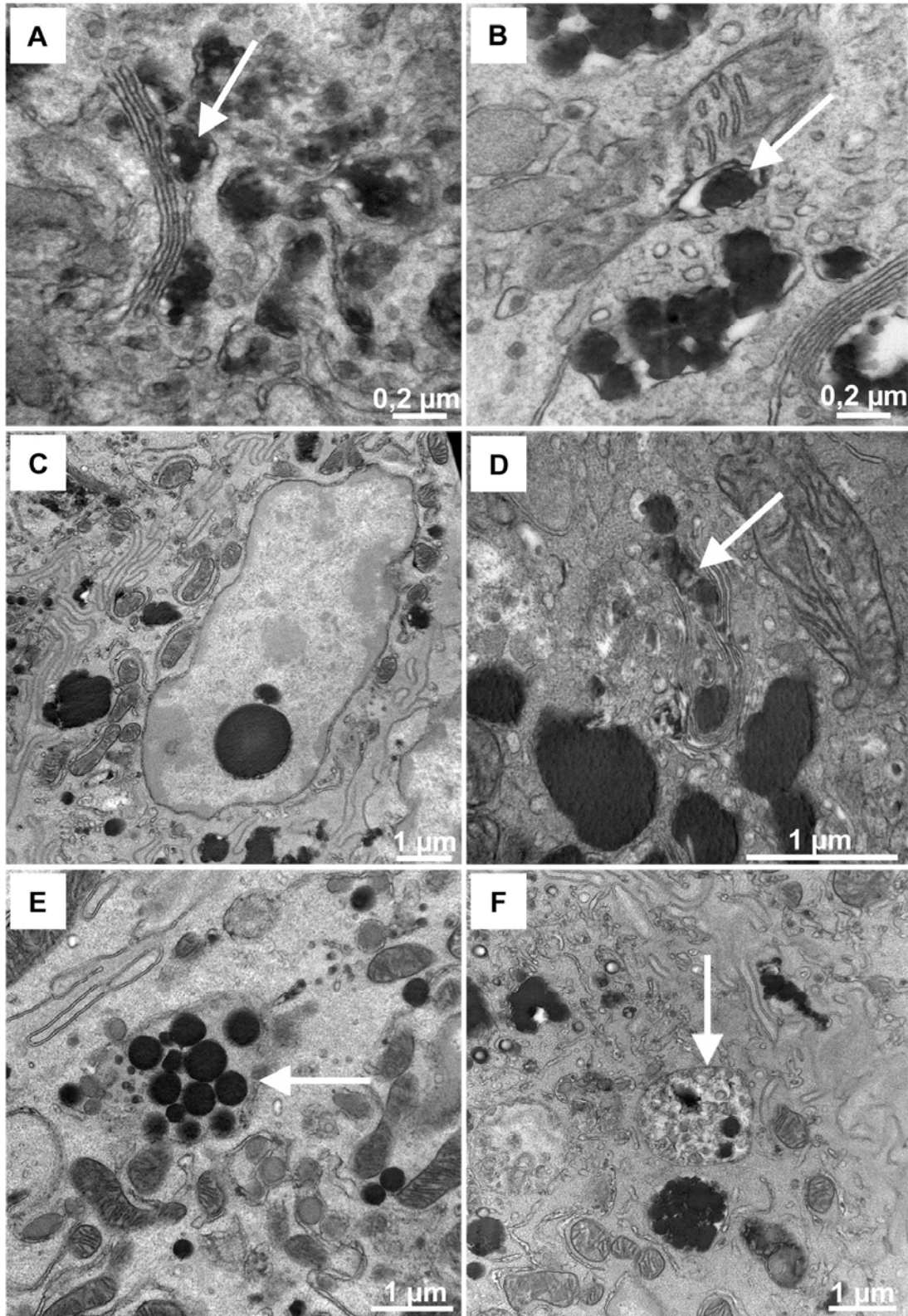


Figure 52. Kao14.

(A) Gouttelettes lipidiques contenues dans des saccules de l'appareil de Golgi (flèche). (B) Gouttelettes lipidiques contenues dans des mitochondries (flèche). (C) Gouttelettes lipidiques présentes dans les noyaux. (D) Saccules de l'appareil de Golgi encerclant des gouttelettes lipidiques (flèche). (E) Formation de lysosomes (flèche). (F) Formation de vacuoles digestives (flèche). (A à F : MET, protocole 3).

Chez ces animaux complémentés en kaolinite, le chorion au centre des villosités semble élargi avec présence de cellules impliquées dans les réactions inflammatoires (Figure 53A). Il est possible de visualiser des granulocytes éosinophiles inactifs dans le chylifère (Figure 53B) ou activés pénétrant dans l'épithélium (Figure 53C). Des mastocytes sont également présents avec des grains de sécrétion plus ou moins contrastés témoignant de leur activation (Figure 53D).

Les mitochondries des entérocytes de certains rats Kao28 sont pour la plupart gonflées (Figure 53E). Leur contenu semble avoir été éliminé par la déshydratation réalisée lors du protocole 1 (Figure 53F).

Enfin, les entérocytes des rats complémentés sont nécrosés, caractérisés par un éclaircissement du cytoplasme (Figure 53G) et la rupture de la membrane apicale (Figure 53H), et ne présentent pas la même morphologie que les cellules en apoptose, caractérisées par un changement nucléaire, une désorganisation du cytosquelette et une densification du cytoplasme (Figure 53I).

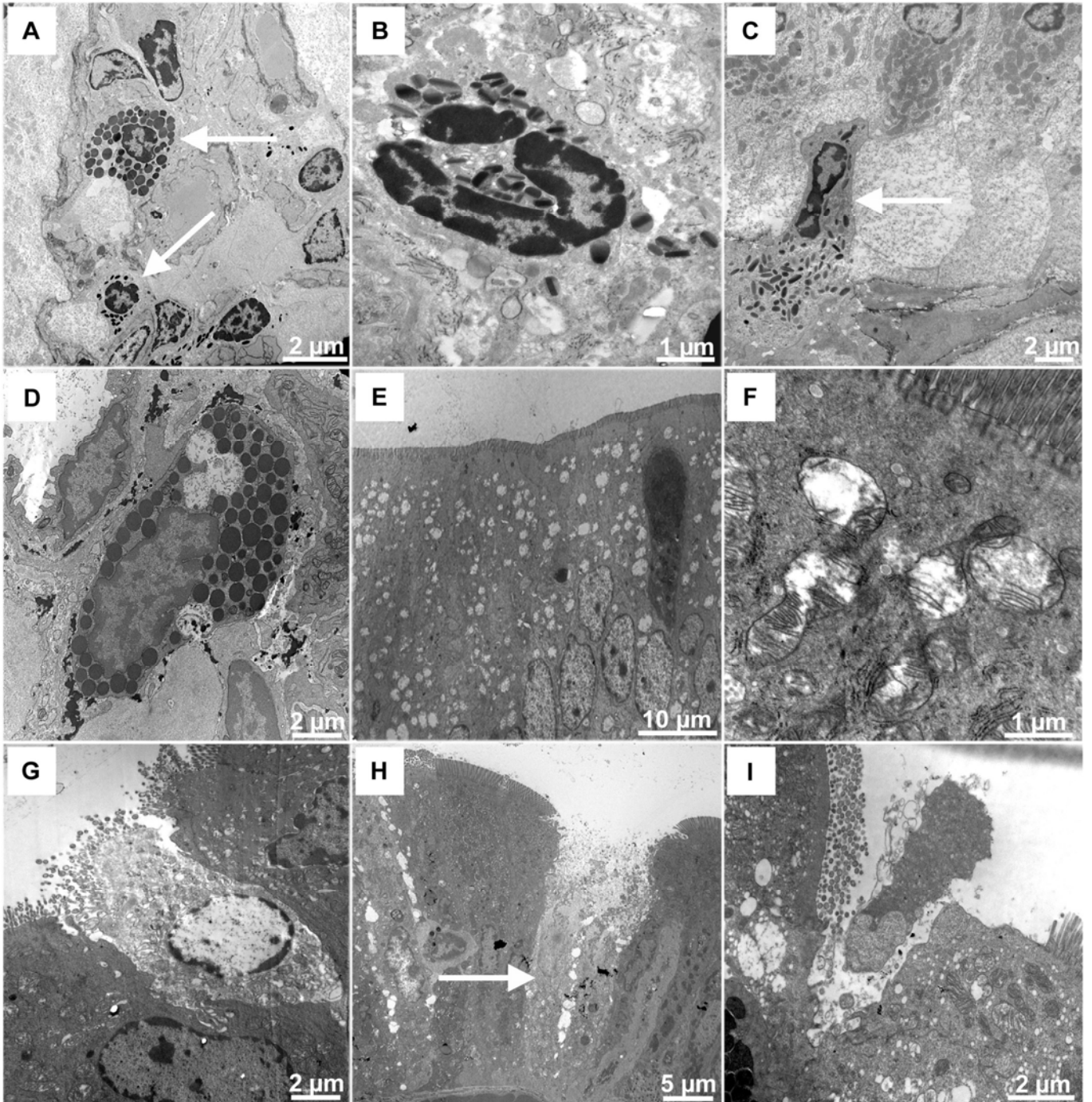


Figure 53. Kao14 et Kao28.

(A) Présence de cellules impliquées dans les réactions inflammatoires dans le chorion (flèches) (Kao28). (B) Granulocyte éosinophile inactif dans le chorion (Kao28). (C) Granulocyte éosinophile activé dans l'épithélium (flèche) (Kao28). (D) Mastocyte avec des grains de sécrétions plus ou moins contrastés dans le chorion (Kao14). (E et F) Mitochondries gonflées et vides (Kao28) (G et H) Entérocyte en nécrose avec rupture de la membrane apicale (flèche) (Kao28). (I) Entérocyte en apoptose (Kao28). (A, B, C, E, F, G, H, I: MET, protocole 1 ; D : Met, protocole 3).

c) MMT28

Les villosités des rats MMT28 sont semblables à celles des rats Kao28 (Figure 54A). Les microvillosités de la bordure en brosse sont courtes (Figure 54B) et de nombreuses gouttelettes lipidiques sont observées dans la zone apicale de la cellule (Figure 54C). Le même cycle d'absorption et de trafic des gouttelettes de lipides est reproduit dans les entérocytes, avec accumulation d'une partie de ces gouttelettes dans l'appareil de Golgi, dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries.

Comme précédemment, ces gouttelettes fusionnent avec les membranes intercellulaires et se déversent dans le chylifère (Figure 54D). Les quantités de lipides observées sont supérieures à celles des NF28 mais inférieures à celles des Kao28.

Les bases des entérocytes sont également élargies, bien que moins volumineuses que celles observées chez les rats Kao28 (Figure 54D). Enfin, comme chez les Kao28, des granulocytes en phase de dégranulation sont présents dans les épithéliums (Figure 54E).

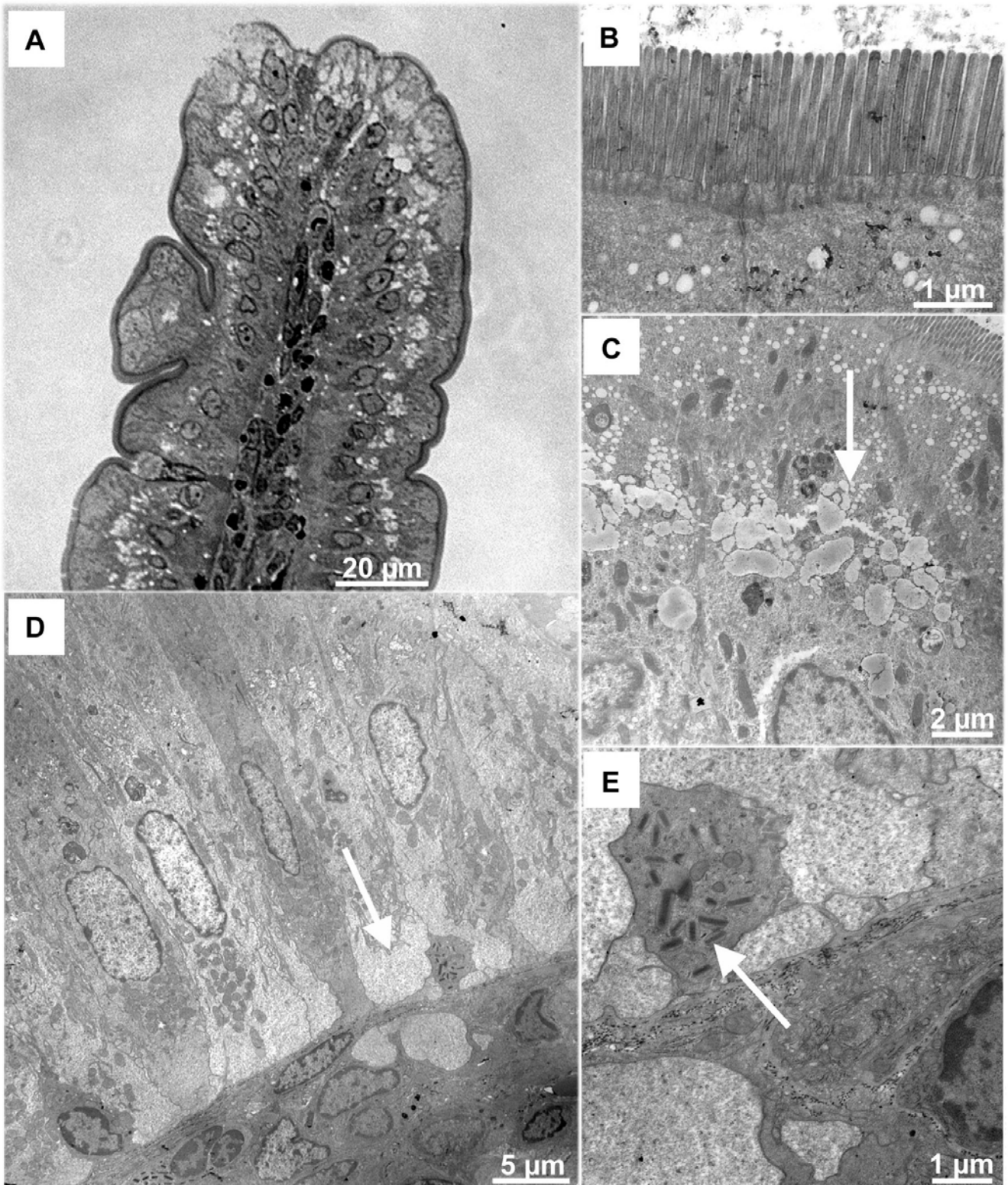


Figure 54. MMT28.

(A) Villosités des rats MMT28. (B). Microvillosités réduites en taille. (C) Gouttelettes lipidiques au niveau médian de l'entérocyte (flèche) (D). Bases élargies (flèche) des entérocytes du sommet des villosités. (E) Granulocyte éosinophile pénétrant dans l'épithélium (flèche). (A à E : MET, protocole 1).

2) Complémentation lors du jeûne

a) NF+P3

Les villosités des rats NF+P3 sont plus courtes et plus fines que celles des rats NF28, avec un chorion rétracté et étroit, et une *lamina propria* désorganisée (Figure 55A). Les entérocytes apparaissent tassés avec un cytoplasme dense, et sont séparés l'un de l'autre par des membranes latérales interdigitées. Les rats NF+P3 ont une bordure en brosse longue et dense. De nombreuses petites vésicules de REL apparemment vides sont présentes dans le cytoplasme. Certaines villosités possèdent des entérocytes avec des bases cellulaires élargies (Figure 55A).

b) Kao7+P3 et Kao7+P3Kao

Les villosités des rats Kao7+P3 ou Kao7+P3Kao présentent un aspect tassé, avec des entérocytes de faibles longueurs, d'aspect dense, et parfois avec des bases élargies (Figures 55B et 55C). Les microvillosités sont plus courtes que chez les animaux NF+P3 (Figure 55D). Les membranes latérales des entérocytes de tous les rats sont invaginées (Figure 55E).

En revanche, les chorions des rats Kao7+P3 ou Kao7+P3Kao sont plus larges que ceux des animaux NF+P3, avec une concentration plus élevée en leucocytes et mastocytes que chez les animaux Kao7, Kao14 et Kao28 (Figure 55F). Les mastocytes observés présentent des signes d'activation et de dégranulation.

Enfin, des entérocytes sont observés en état de mort cellulaire, caractéristique déjà notée lors de l'entrée en phase III du jeûne (Habold et al., 2005).

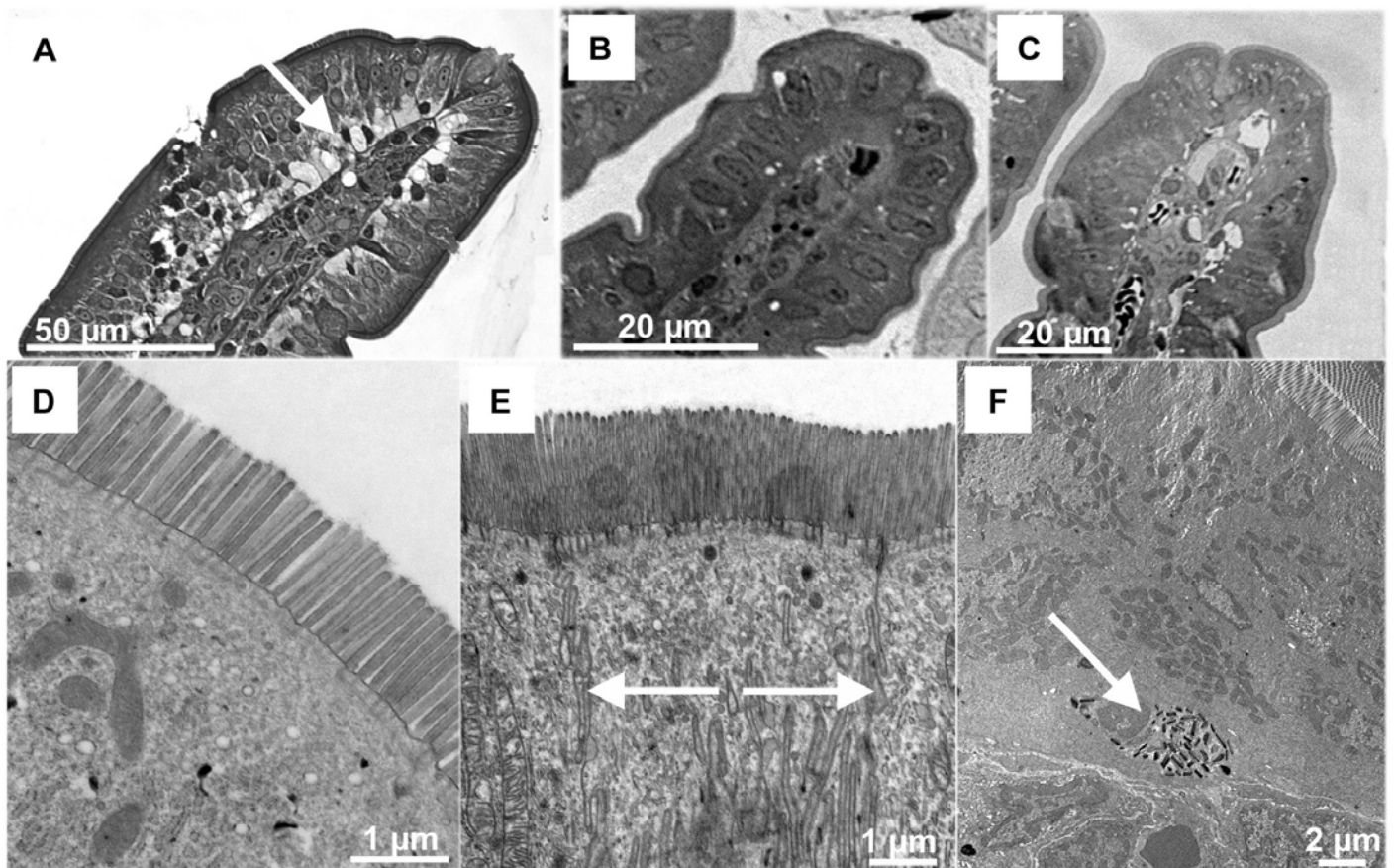


Figure 55. NF+P3, Kao7+P3 et Kao7+P3Kao.

(A) Villosité de rats NF+P3 avec des entérocytes aux bases élargies (flèche). (B) Villosité de rat Kao7+P3. (C) Villosité de rat Kao7+P3Kao. (D) Microvillosités des rats Kao+P3 réduites en taille par rapport à celles des rats NF+P3. (E). Membranes latérales (flèches) des entérocytes invaginées chez tous les rats (ici rat NF+P3). (F) Granulocyte éosinophile (flèche) dans le chorion des animaux ayant jeûné (ici rat Kao7+P3Kao). (A à F : MET, protocole 1).

3) Complémentation lors de la réalimentation

a) RéaNF et RéaNF(-)

Les villosités des rats RéaNF et RéaNF(-) sont plus grandes comparés aux rats NF14 et NF28 (Figures 56A et 56B). Les sommets des entérocytes sont élargis par rapport à l'ensemble de la villosité, consécutivement à l'élargissement des bases des entérocytes retrouvés chez tous les animaux réalimentés. Les entérocytes présents à ce niveau contiennent tous de nombreuses gouttelettes lipidiques (Figure 56C).

De nombreuses gouttelettes lipidiques sont visibles dans la zone apicale des cellules des rats RéaNF et RéaNF(-). La bordure en brosse des cellules des rats RéaNF est semblable à celle des animaux NF14 et NF28, alors que celles des rats RéaNF(-) sont plus denses (Figure 56D et 56E).

Chez les rats RéaNF et RéaNF(-), les gouttelettes fusionnent au niveau de l'appareil de Golgi en grosses gouttes avant de rentrer dans un cycle similaire à celui décrit pour les NF14 ou NF28 (Figure 56F). Dans les cellules, les appareils de Golgi et les mitochondries contiennent des lipides (Figures 56G et 56H). Le volume des espaces de Grünhagen est considérablement augmenté avec présence de lipides et de fragments membranaires (Figure 56I). Il y a présence de granulocytes et de mastocytes dans le chorion sous les entérocytes dont les bases étaient élargies (Figure 56J).

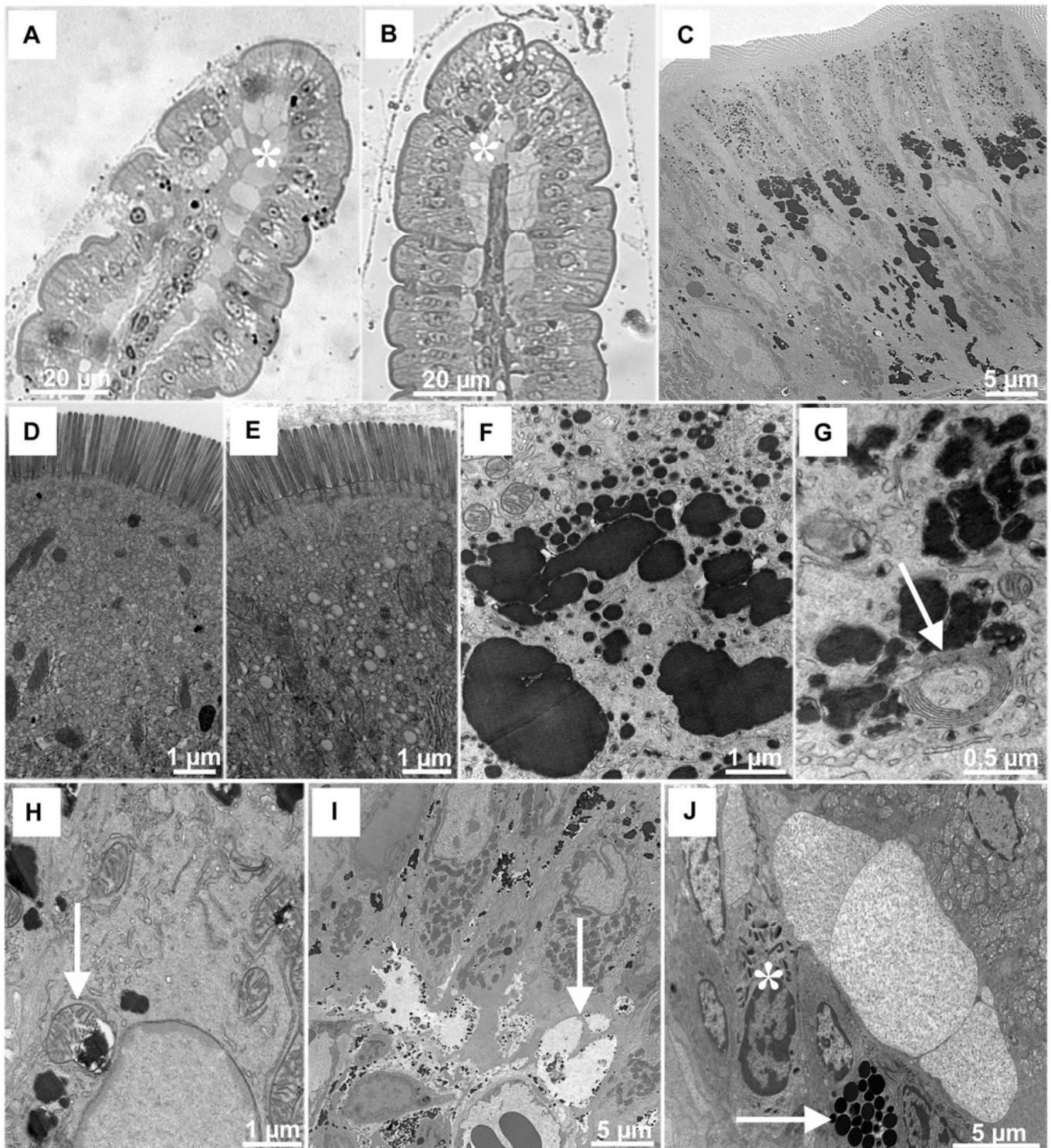


Figure 56. RéaNF et RéaNF-.

(A) Villosité de rat RéaNF avec des entérocytes aux bases élargies (étoile). (B) Villosité de rat RéaNF(-) avec des entérocytes aux bases élargies (étoile). (C) Gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des rats RéaNF et RéaNF- (ici rat RéaNF). (D) Microvillosités des RéaNF longues et fines, par rapport à (E) celles des rats RéaNF-. (F) Gouttelettes lipidiques fusionnant pour former des gouttes de lipides (ici rat RéaNF). (G) Lipides dans des saccules de l'appareil de Golgi (flèche). (H) Lipides dans une mitochondrie (flèche) (I) Espaces de Grünhagen élargis (flèche). (J) Bases élargies des entérocytes, avec présence dans le chorion de granulocytes éosinophiles (astérisque) et de mastocytes (flèche). (A, B : MP, protocole 1 ; C à J : protocole 3 ou 4).

b) RéaKao

Les villosités des rats RéaKao ont un aspect similaire à celles des rats RéaNF (Figure 57A). Les bases des entérocytes sont très élargies, ainsi que les espaces extracellulaires.

Des petites particules de kaolinite de tailles variables sont observées au niveau du mucus. Elles semblent être au contact des microvillosités (Figures 57B et 57C) et liées au mucus (Figure 57D). Les observations au MET montrent chez les rats complémentés avec de la kaolinite un glycocalyx qui semble stabilisé par la présence de l'argile (Figure 57E).

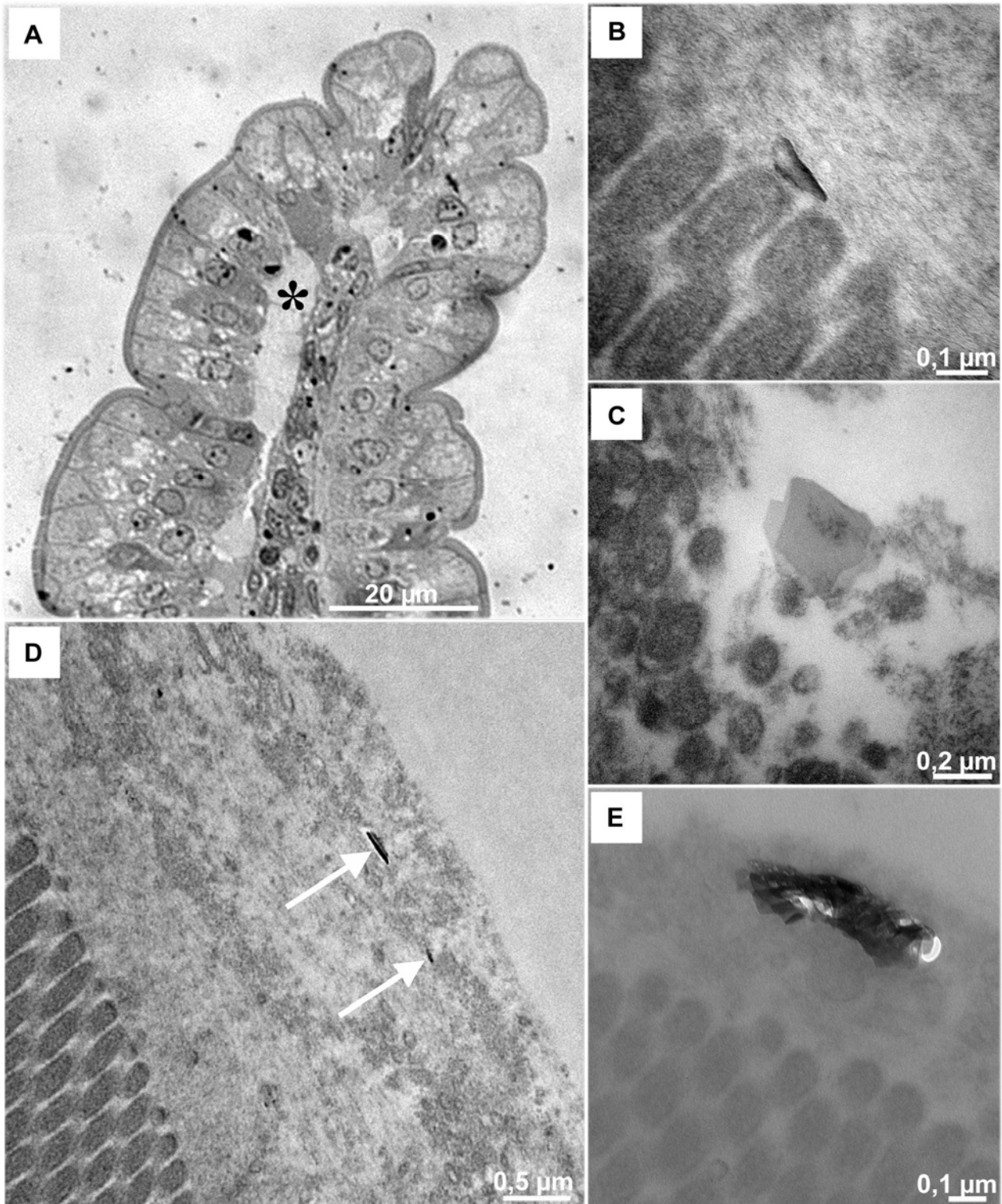


Figure 57. RéaKao (1).

(A) Villosité de rats RéaKao avec des bases cellulaires élargies (astérisque) et des gouttelettes lipidiques dans les entérocytes. (B et C) Particules de kaolinite avec une structure en feuillets. (D et E) Particules de kaolinite dans le mucus et le glycocalyx (flèches). (A: MP, protocole 1; B à, E: MET, protocole 2).

Tous les entérocytes présentent de très volumineuses gouttes lipidiques visibles au dessus des noyaux, et qui résultent de la fusion de gouttelettes déjà plus volumineuses que celles observées chez tous les autres animaux (Figure 58A). Les bordures en brosse des entérocytes des rats RéaKao sont plus courtes et denses que celles des animaux RéaNF (Figure 58B). Dans l'ensemble des cellules, les organites cytoplasmiques sont envahis de lipides, qui amplifient encore le phénomène observé chez les Kao14 et Kao28. La morphologie des cellules est modifiée ; au niveau basal, les espaces de Grünhagen sont très nombreux et très dilatés (Figure 58B), et au niveau apical, les microvillosités qui constituent la bordure en brosse de ces animaux sont courtes et larges (Figure 58C).

La formation de gouttes lipidiques atteint des proportions très importantes dans certains entérocytes, suggérant dans ce cas une saturation lipidique allant jusqu'à la présence de gouttelettes lipidiques dans des lysosomes avec formation de vacuoles autophagiques, et dans des mitochondries (Figures 58D, 58E et 58F). Il y a présence de vacuoles cytosoliques avec des doubles membranes dans les espaces intercellulaires (Figure 58G) qui se retrouvent dans les espaces de Grünhagen (Figure 58H). Enfin, certains des entérocytes semblent en nécrose avec gonflement des mitochondries et fragmentation des microvillosités (Figure 58I), allant jusqu'au détachement des cellules de l'épithélium (Figure 58J).

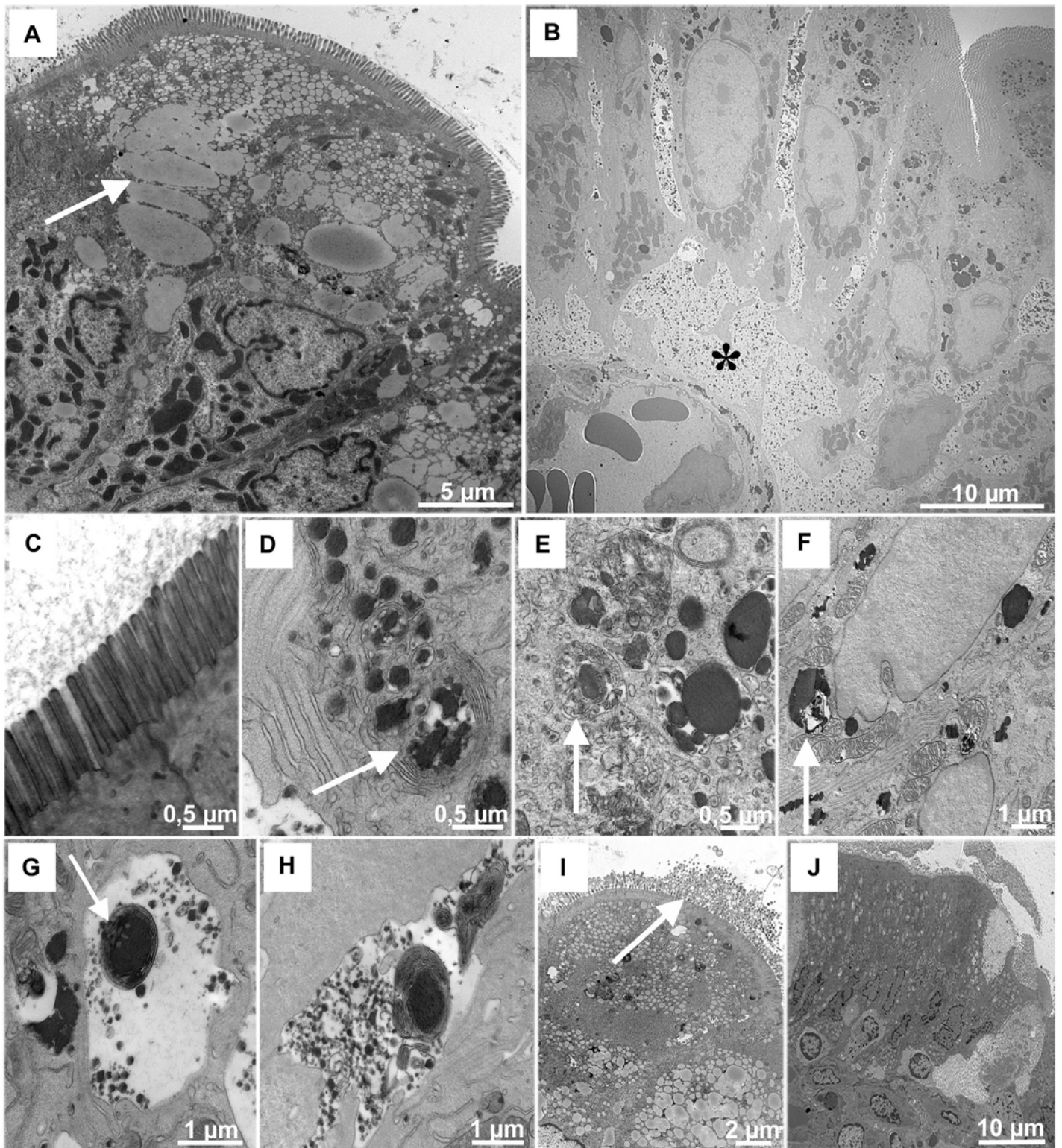


Figure 58. RéaKao (2).

(A) Présence de nombreuses gouttelettes lipidiques (flèche) dans les entérocytes. (B) Espaces de Grünhagen (astérisque) remplis de lipides et très élargis. (C). Microvillosités courtes et larges. (D). Gouttelettes de lipides dans des saccules de l'appareil de Golgi qui commence à s'enrouler (flèche). (E) Formation de vacuoles autophagiques (flèche). (F) Gouttelettes lipidiques dans les mitochondries (flèche) et autour des noyaux. (G et H) Présence de corps multimembranaires (flèche) dans les espaces intercellulaires. (I et J) Entérocytes en nécrose se détachant de l'épithélium avec rupture de la bordure en brosse (flèche). (A, B: MET, protocole 1; C à J : MET, protocole 3).

4) Complémentation lors de la restriction

a) Normalement nourris avec restriction NF14(-)

Les villosités sont plus petites et plus fines que celles des animaux NF14 (Figure 59A). Les entérocytes semblent plus larges et moins longs, avec un cytoplasme dense aux électrons (Figure 59B). Les membranes latérales sont invaginées, la *lamina propria* est désorganisée et le chorion rétracté comme chez les rats NF+P3 (Figure 59B). La bordure en brosse est longue et dense, les microvillosités qui la composent sont longues et fines (Figure 59C).

Les entérocytes présentent une courbure vers le sommet des villosités (Figure 59D). Une dégénérescence est visible dans de nombreux entérocytes du sommet des villosités, phénomène plus accentué chez ces animaux que chez les animaux des autres conditions expérimentales (Figure 59E et 59F).

La majorité des vésicules de REL apparaissent vides mais quelques unes contiennent quand même de très petites gouttelettes lipidiques ; il y a présence de nombreux lysosomes primaires (Figure 59G). Des petites gouttelettes lipidiques sont observées dans des saccules de l'appareil de Golgi (Figure 59G).

Au sommet des villosités, les bases des entérocytes sont élargies (Figure 59H). Des leucocytes sont observés dans le chorion de ces animaux: une grande proportion de granulocytes éosinophiles est activée et infiltrée dans l'épithélium (Figure 59I).

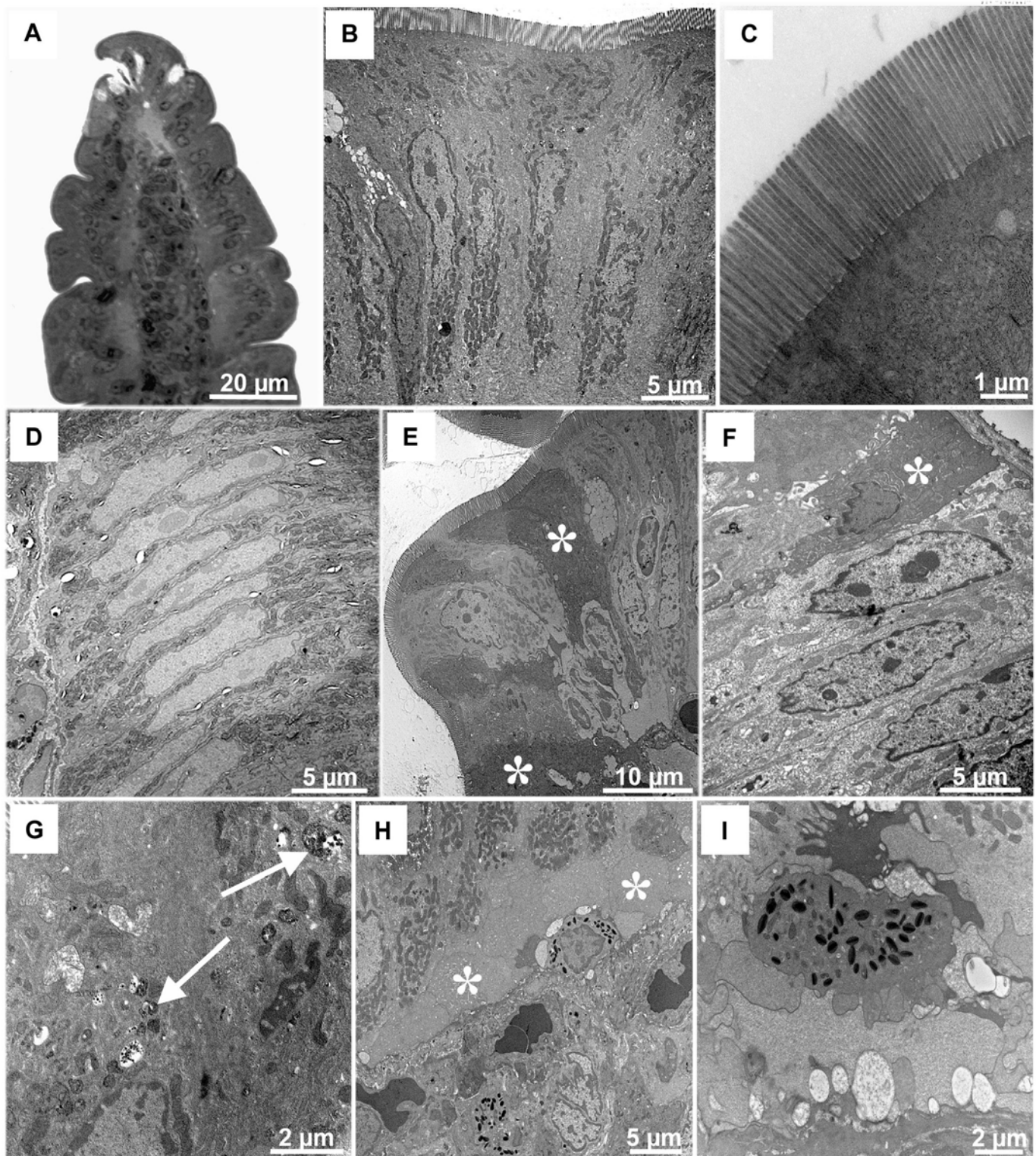


Figure 59. NF14(-).

(A) Villosité de rats NF14(-). (B). Entérocytes étroits avec membranes invaginées. (C). Microvillosités longues et fines. (D). Entérocytes avec une courbure. (E et F) Entérocytes en état de mort cellulaire (astérisques). (G) Présence de vacuoles de REL et de lysosomes primaires (flèches) dans le cytoplasme des cellules. (H). Bases des entérocytes élargies (astérisques). (I) Présence de granulocytes éosinophiles dans l'épithélium. (A: MP, protocole 1 ; D, G, H, I: MET, protocole 1; B, C, E, F: MET, protocole 4).

b) Restreints avec complémentation en kaolinite Kao14(-)

De même que les villosités des rats NF14(-), celles des Kao14(-) sont réduites et fines par rapport à celles des rats Kao14 (Figure 60A). Les entérocytes, plus larges et moins longs, ont un cytoplasme dense et des bases élargies (Figure 60B). Les microvillosités sont moins longues et moins fines que celles des rats NF14(-) (Figure 60C)

Dans la zone apicale, un plus grand nombre de petites gouttelettes lipidiques sont observées dans le REL par rapport aux rats NF14(-) en moindre quantité que celles observées chez NF14 (Figure 60D). Des accumulations lipidiques sont retrouvées dans les saccules de l'appareil de Golgi ainsi que les fusions membranaires et le passage des lipides dans les espaces intercellulaires (Figure 60E). Des enroulements de saccules provenant de l'appareil de Golgi sont observés autour de gouttelettes lipidiques ainsi que des lysosomes avec présence de vacuoles digestives à la base des cellules (Figure 60F). Il est également possible d'observer de nombreux granulocytes éosinophiles dans le chorion et dans l'épithélium des villosités, dont une grande partie est activée (Figure 60G), ainsi que des petites vésicules ayant l'aspect de celles de REL dans les bases élargies des entérocytes des sommets (Figure 59H).

Enfin, concernant ces bases cellulaires élargies, il a été possible de marquer spécifiquement l'actine contenue dans le cytosquelette et de l'observer en microscopie confocale ; ce marquage a permis de visualiser les membranes latérales et les bases des cellules, où des filaments d'actine délimitent les zones d'élargissement observées en TEM (Figure 60H et 60I).

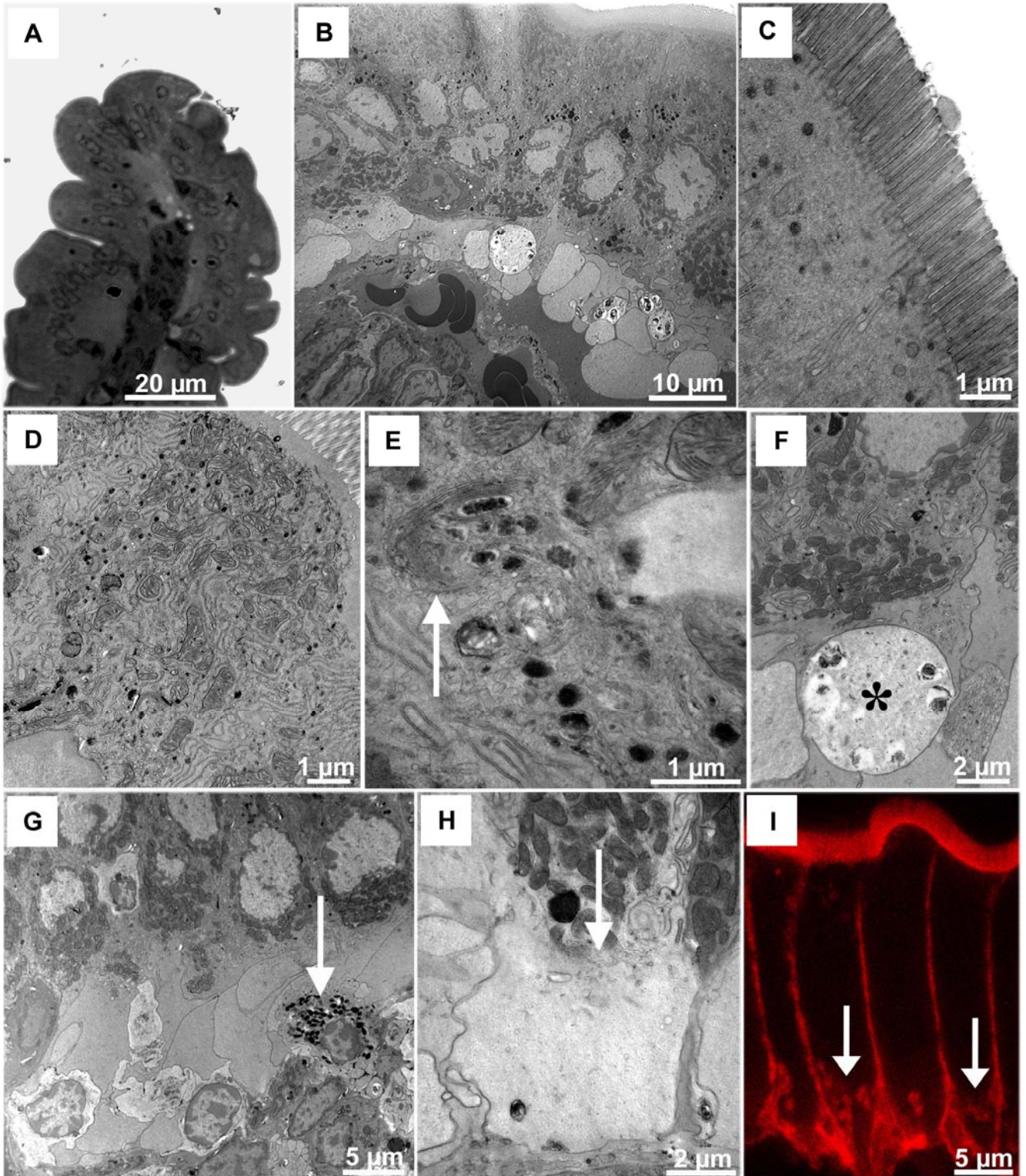


Figure 60. Kao14(-).

(A) Villosité de rats Kao14(-) tassée et étroite. (B) Entérocytes larges avec des membranes invaginées et des bases élargies. (C) Microvillosités comparables aux animaux NF14. (D). Entérocytes avec petites gouttelettes de lipides dans les vésicules de REL. (E). Faible accumulation lipidique (flèche) dans les saccules de l'appareil de Golgi. (F). Présence de vacuoles digestives (astérisque). (G) Présence de granulocytes éosinophiles (flèche) au niveau des bases des entérocytes. (H et I) Bases élargies des entérocytes délimitées par une structure (flèche) contenant des microfilaments d'actine (flèches). (A: MP, protocole 1 ; C, G, H : MET, protocole 1; B, C, E, F: MET, protocole 3 ou 4 ; I : MC).

5) Tableau récapitulatif des observations histologiques

Les différentes observations faites en MET ont été répertoriées dans un tableau récapitulatif et comparées de façon qualitative (0: niveau basal, les notations + à +++ ou - à -- correspondent à la quantité relative du nombre d'observations faites).

	Lipides	Espaces Intracellulaires	Espaces Extracellulaires	Cellules de l'inflammation	Mort Cellulaire	Autophagie (voir discussion)
NF	0	0	0	0	0	0
Kao7	+	0	0	0	+	0
Kao14	++	+	+	+	++	++
Kao28	++	++	+	++	++	++
MMT28	+	+	+	+	0	+
NF+P3	-	++	-	++	++	+
Kao7+P3	-	++	-	++	++	+
Kao7+P3Kao	-	++	-	++	++	+
RéaNF	+++	+++	+++	++	+	++
RéaNF(-)	++	+++	+++	++	+	++
RéaKao	+++	+++	+++	++	+	+++
NF14(-)	-	++	-	++	++	+
Kao14(-)	-	++	-	+++	+	+

B. Mesures morphométriques

1) Complémentation à long terme

a) Expérience NF28, Kao7 et Kao28

Les longueurs des villosités intestinales des rats NF28, Kao7 et Kao28 sont similaires. Les villosités des rats Kao28 sont plus larges de 14,4 % par rapport à celles des rats NF28 (Figure 61) (Tableau 3.1-1).

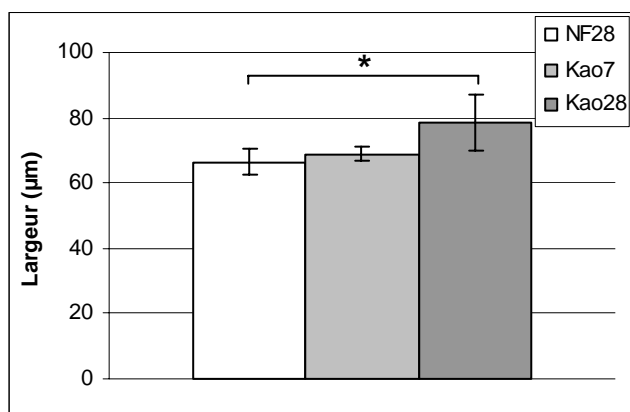


Figure 61. Largeur des villosités des rats NF28, Kao7 et Kao28.

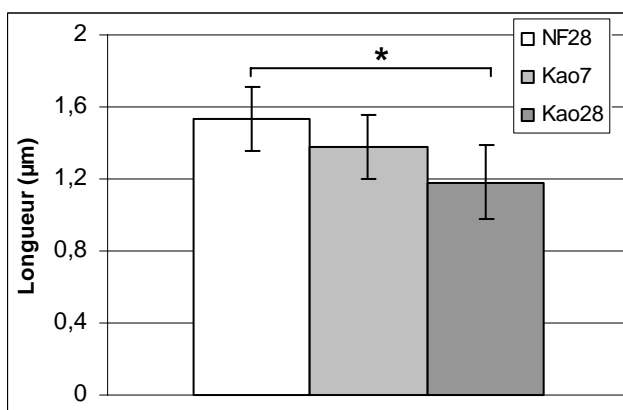


Figure 62. Longueur des microvillosités des rats NF28, Kao7 et Kao28.

Les microvillosités des rats Kao7 ne sont pas significativement différentes de celles des NF28 et des Kao28. En revanche, celles des rats Kao28 sont plus courtes de 21,24 % par rapport à celles des animaux NF28 (Figure 62). Les rats NF28, Kao7 et Kao28 ont des entérocytes de même largeur et des microvillosités de densité similaire (Tableau 3.1-1).

Il n'y a pas de différence significative au niveau de la longueur des racines des microvillosités entre les rats NF28 et Kao28 (Tableau 3.1-1). En revanche, la longueur moyenne des filaments d'actine des rats Kao28 est inférieure de 16,87 % par rapport à celles des rats NF28 (Figure 63) (Tableau 3.1-2).

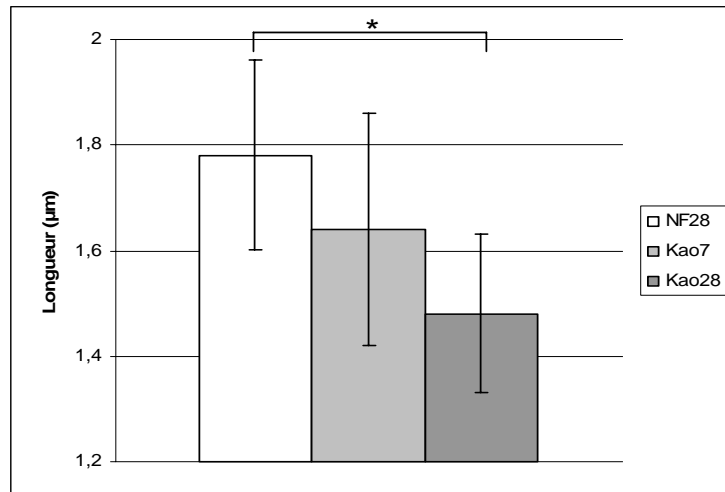


Figure 63. Longueur des microfilaments d'actine des rats NF28, Kao7 et Kao28.

b) Expérience NF28, Kao28 et MMT28

Les villosités des rats NF28, Kao28 et MMT28 sont de longueur et de largeur similaires (Tableau 3.2-1). En revanche, les microvillosités de rats Kao28 et MMT28 sont plus courtes de 10 et 9,6 % par rapport à celles des rats NF28 (Figure 64) (Tableau 3.1-2).

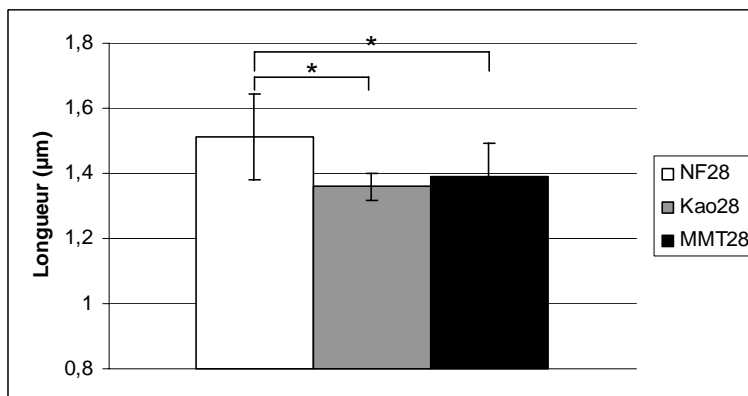


Figure 64. Longueur des microvillosités des rats NF28, Kao28 et MMT28.

Les rats NF28, Kao28 et MMT28 ont des microvillosités de largeurs, densités, surfaces et volumes similaires (Tableau 3.2-2).

2) Complémentation durant le jeûne

A l'entrée en phase III du jeûne, les rats Kao7+P3 ont des microvillosités plus courtes de 24,58 % par rapport à celles des rats NF+P3 (Figure 65). En revanche, les microvillosités des rats Kao7+P3Kao sont similaires à celles des rats NF+P3 et Kao7+P3. Enfin, il n'y a aucune différence dans la densité des microvillosités des rats NF+P3, Kao7+P3 et Kao7+P3Kao à la fin du jeûne (Tableau 3.-3).

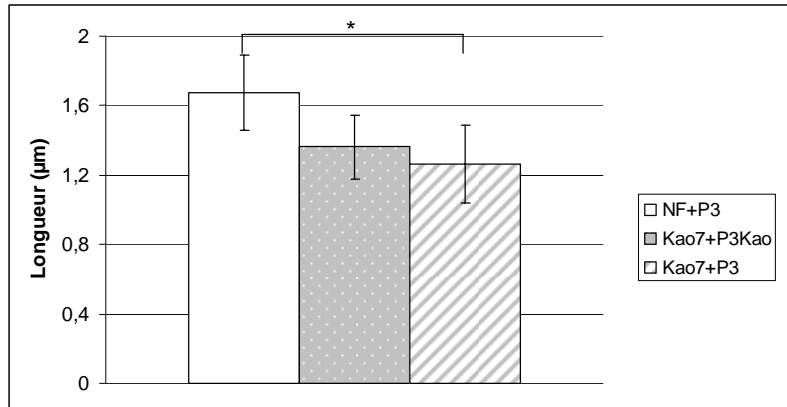


Figure 65. Longueur des microvillosités des rats NF+P3, Kao7+P3Kao et Kao7+P3.

3) Complémentation durant la réalimentation

Toutes les données obtenues en ce qui concerne les rats RéaKao1 et RéaKao2 sont similaires. Elles sont rassemblées en un seul groupe nommé RéaKao.

Les rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-) ont des villosités de longueur et de largeur similaires. De même, les largeurs apicales des entérocytes sont similaires (Tableau 3.4-1).

Les microvillosités des rats RéaKao sont plus courtes de 22,6 % comparées à celles des rats RéaNF et de 16,2 % par rapport à celles des rats RéaNF(-) (Figure 66). Comparées aux rats RéaNF, les largeurs des microvillosités des rats RéaKao ou RéaNF(-) sont augmentées, de 22,1 et de 16,7 % respectivement (Figure 67) (Tableau 3.4-2).

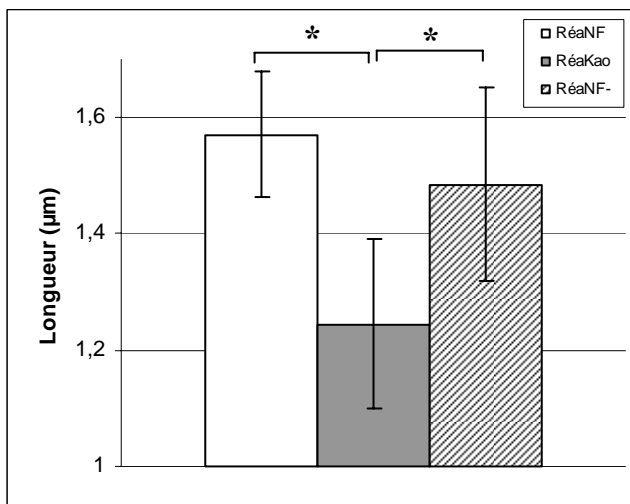


Figure 66. Longueur des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.

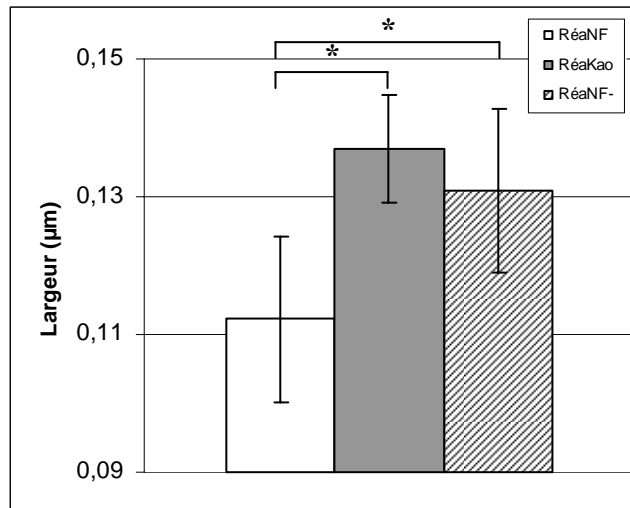


Figure 67. Largeurs des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.

Les densités moyennes des microvillosités des rats RéaKao ou RéaNF(-) sont diminuées de 11,5 et 9,4 % respectivement par rapport à celles des rats RéaNF (Figure 68) (Tableau 3.4-2).

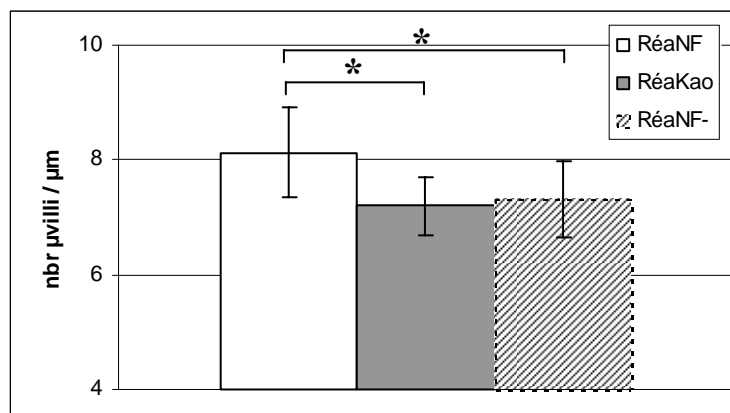


Figure 68. Densités des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.

La surface moyenne des microvillosités des rats RéaKao est réduite de 10,3 % par rapport à celle des rats RéaNF(-), alors qu'il n'y a pas de différence avec celles des rats RéaNF et RéaKao et entre les rats RéaNF et RéaNF(-) (Figure 69). De plus, le volume des microvillosités des rats RéaNF(-) est supérieur de 22,2 % par rapport à celui des rats RéaNF, alors qu'il n'y a aucune différence significative entre celui des rats RéaNF et RéaKao et celui des rats RéaKao et RéaNF(-) (Figure 70) (Tableau 3.4-2).

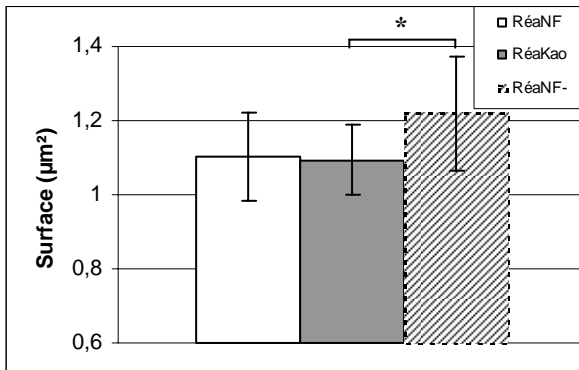


Figure 69. Surface des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.

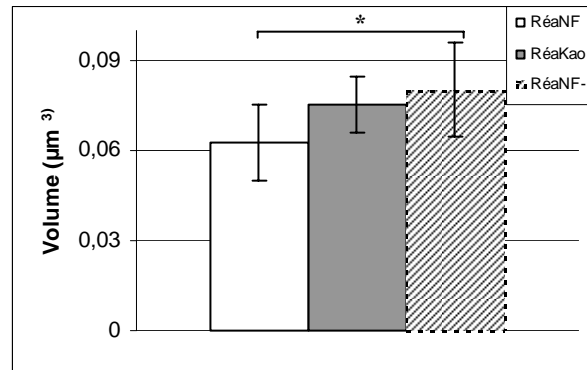


Figure 70. Volume des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.

4) Complémentation pendant une restriction

Les villosités des rats NF14 et Kao14 ont des longueurs similaires, tout comme les villosités des rats NF14(-) et Kao14(-). Les villosités des rats NF14(-) sont plus courtes que celles des rats NF14 de 23,42 %, alors que les villosités des rats Kao14(-) sont plus courtes de 16,7 % par rapport à celles des rats Kao14 (Figure 71) (Tableau 3.5-1).

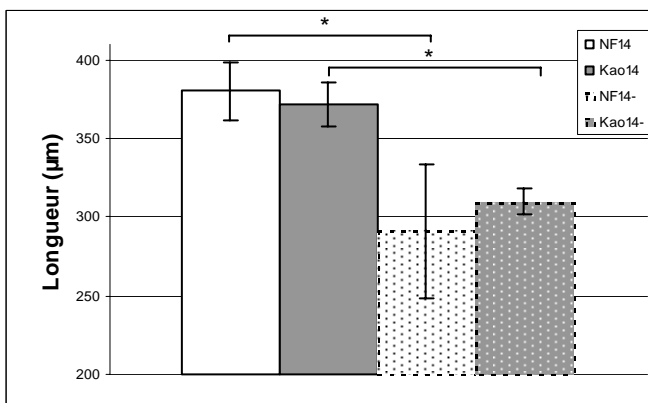


Figure 71. Longueur des villosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

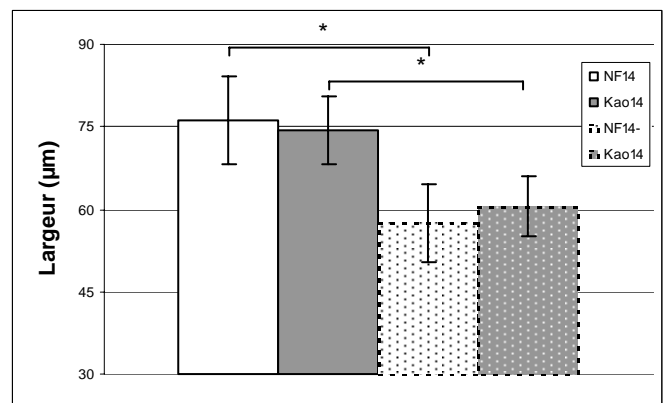


Figure 72. Largeur des villosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

Les villosités des rats NF14 et Kao14 sont de largeur similaire, ainsi que celles des rats NF14(-) et Kao14(-). En revanche, les villosités des rats NF14(-) sont de 18,5 % moins larges que celles des rats NF14, celles des rats Kao14(-) sont de 24,3 % moins larges que celles des rats Kao14 (Figure 72) (Tableau 3.5-1).

Les microvillosités des rats Kao14 sont plus courtes de 15,1 % que celles des NF14. Chez les animaux restreints, les microvillosités des rats NF14(-) sont plus longues de 29,6 % que celles des rats NF14 et de 34,5 % que de celles des Kao14 (Figure 73). Les microvillosités des rats Kao14(-) sont plus courtes de 17,83 % que celles des rats NF14(-). En revanche, elles sont plus longues de 25.38 % que celles des rats Kao14, mais ne sont pas différentes de celles des rats NF14 (Figure 73) (Tableau 3.5-2).

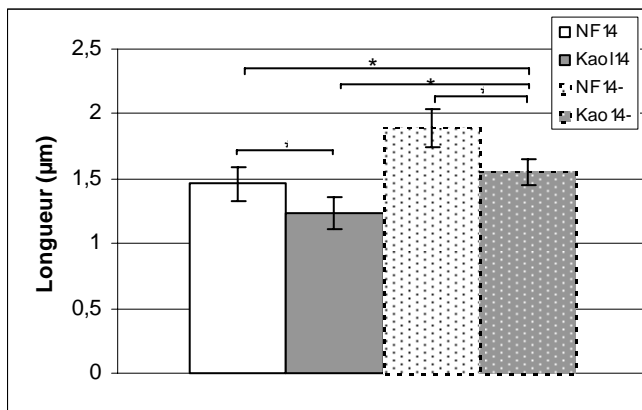


Figure 73. Longueurs des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

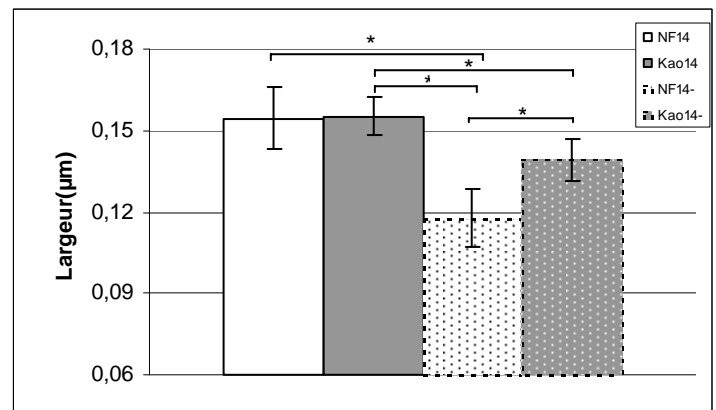


Figure 74. Largeurs des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

La largeur moyenne des microvillosités des rats NF14 est similaire à celle des rats Kao14 et Kao14(-) mais est plus grande de 23,78 % que celle des rats NF14(-) (Figure 74). Celle des rats Kao14 est supérieure de 24,3 % à celles des rats NF14(-) et supérieure de 10,3 % à celles des rats Kao14(-); celle des rats NF14(-) est plus courte que celle des rats NF14, Kao14 et Kao14(-), respectivement de 23,8, 24,3 et 15,6 % (Figure 74) (Tableau 3.5-2).

Les rats NF14, Kao14 et Kao14(-) ont des microvillosités de densité similaire. Celles des rats NF14(-) sont plus denses que celles des rats NF14, Kao14 et Kao14(-), respectivement de 11,6, 17,3 et 17,3 % (Figure 75) (Tableau 3.5-2).

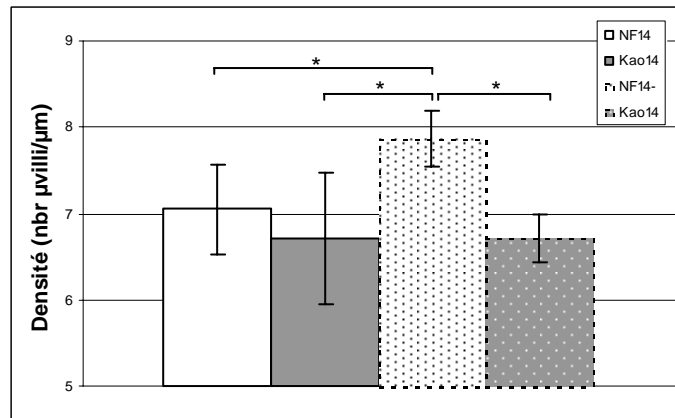


Figure 75. Densité des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

La longueur moyenne des racines des microfilaments d'actine sous-membranaire des rats NF14, Kao14 et Kao14(-) est similaire. Celle des rats Kao14 est plus importante que celles des rats NF14, Kao14 et Kao14(-), respectivement de 18,3, 28,4 et 24,4 % (Figure 76) (Tableau 3.5-2).

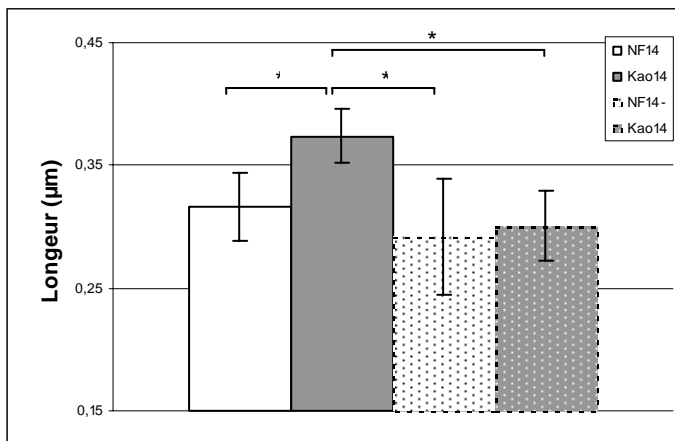


Figure 76. Longueur des racines des microfilaments d'actine des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

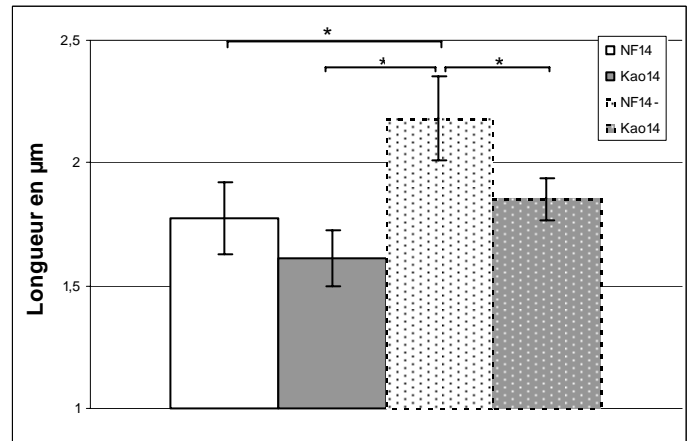


Figure 77. Longueur totale des filaments d'actine des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

La longueur totale moyenne des filaments d'actine qui constituent les microvillosités des rats NF14, Kao14 et Kao14(-) est similaire. Celle des rats NF14(-) est plus grande que celles des rats NF14, Kao14 et Kao14(-), respectivement de 22,9, 35,3 et 17,7 % (Figure 77) (Tableau 3.5-2).

Pour finir, les surfaces moyennes des microvillosités des animaux des rats NF14, Kao14, NF14(-) et Kao14(-) ne sont pas différentes. Les volumes moyens des microvillosités des rats NF14, Kao14 et Kao14(-) ne sont pas différents, celui des rats NF14(-) est diminué de 26 % par rapport à celui des rats NF14 (Figure 78) (Tableau 3.5-2).

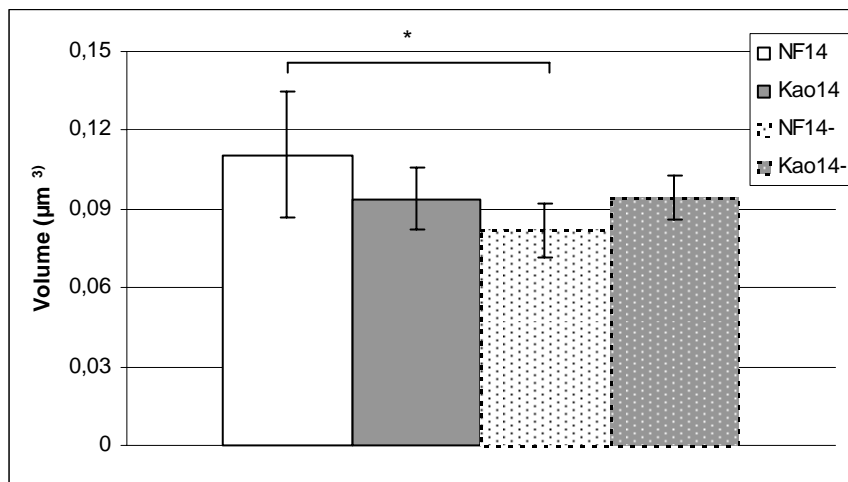


Figure 78. Volume des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.

8. DOSAGES

8.1. Teneurs en aluminium

A. Complémentation à long terme

La teneur moyenne en aluminium mesurée par absorption atomique dans le sang des rats Kao28 est supérieure à celles des rats NF28 et MMT28 ($[Al]_{Kao} > [Al]_{NF} = [Al]_{MMT}$) (Figure 79). Par rapport aux animaux NF28, l'augmentation de la teneur en aluminium chez les rats Kao28 est de 53,2 % (Figure 79) (Tableau 4-1).

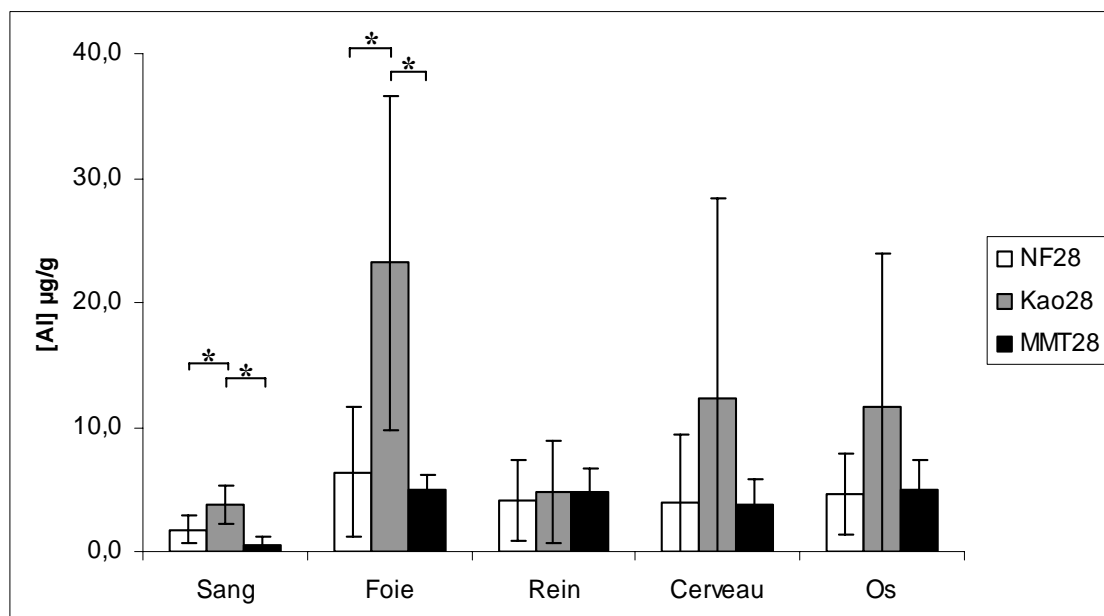


Figure 79. Concentration en aluminium dans différents tissus des rats NF28, Kao28 et MMT28.

La teneur en aluminium dans le foie des animaux Kao28 est élevée et statistiquement supérieure chez les animaux complétementés en kaolinite par rapport aux animaux des deux autres groupes ($[Al]_{Kao} > [Al]_{NF} = [Al]_{MMT}$). Cette augmentation de la teneur en aluminium dans le foie chez les rats Kao28 est de 72,4 % par rapport aux rats NF28. En revanche, les concentrations en aluminium des NF28, Kao28 et MMT28 ne sont pas différentes dans le cerveau, dans les reins et dans l'os du crâne (Tableau 4-1).

Il est possible de différencier deux groupes parmi les rats Kao28: l'un avec le foie saturé en aluminium ($[Al]_{\text{foie}} > \text{moyenne } [Al]_{\text{foie}}$) et l'autre avec un foie moins saturé ($[Al]_{\text{foie}} < \text{moyenne } [Al]_{\text{foie}}$). Les rats du premier groupe ($n = 4$) ont de faibles teneurs en aluminium dans les reins, le cerveau et l'os du crâne, et leurs consommations en kaolinite le dernier jour sont hétérogènes. Les rats du second groupe ont deux types de réponses : les animaux qui ingèrent peu d'argile le dernier jour ont des teneurs en aluminium élevées dans le cerveau ou dans l'os du crâne – jamais les deux en même temps ($n = 2$), et les animaux qui ingèrent beaucoup d'argile le dernier jour ont de faibles teneurs en aluminium dans ces deux organes ($n = 3$). Le nombre très limité d'animaux examinés incite à la grande prudence dans la description des tendances observées.

Cependant, ces résultats sont similaires aux données préliminaires obtenues chez des rats Long Evans utilisés dans l'étude des effets de l'ingestion régulière de kaolinite sur les rythmes circadiens que nous avons menée en collaboration avec M. Etienne Challet. Des dosages par absorption atomique ont révélé des teneurs plus élevées en aluminium dans le sang et le foie après 75 jours de complémentation (Reichardt et al., 2007) (Figure 80).

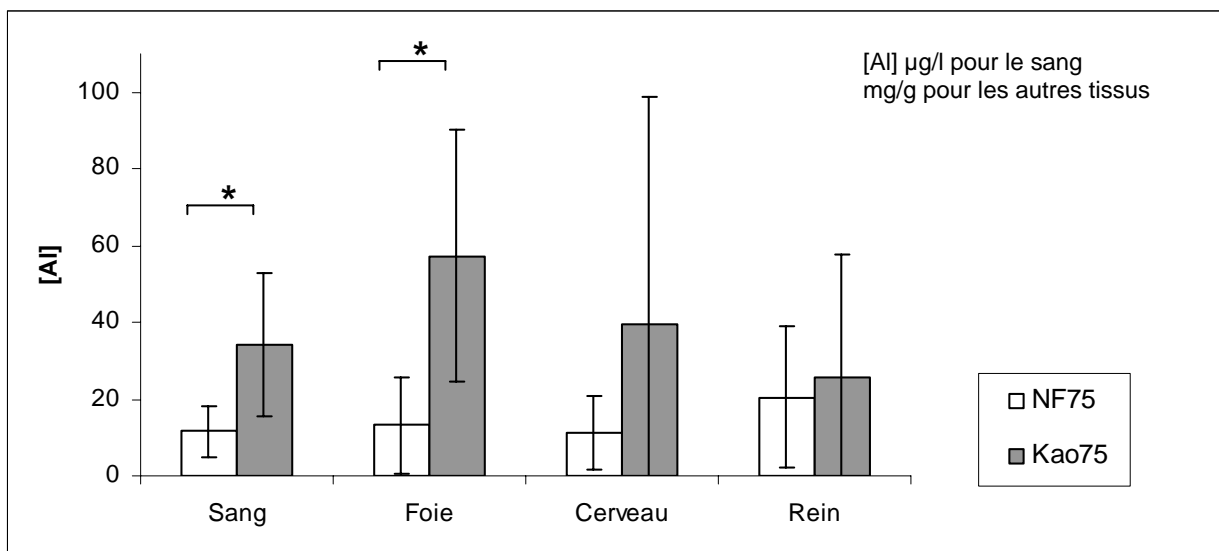


Figure 80. Teneurs en aluminium après 75 jours de complémentation en kaolinite chez des rats Long Evans.

B. Complémentation durant la réalimentation

Les résultats des dosages par spectrométrie de masse à partir des lyophilisats montrent des différences significatives dans les teneurs en aluminium des rats réalimentés. La teneur en aluminium moyenne des animaux RéaKao1 est presque quatre fois plus élevée que celle des rats RéaNF dans l'expérience 3a. De la même façon, la teneur en aluminium des animaux RéaKao2 est plus de sept fois supérieure à celles des animaux RéaNF(-) dans l'expérience 3b (Tableau 4-2).

Il n'y a aucune différence en revanche en ce qui concerne les teneurs en fer, manganèse, titane, chrome, cobalt, nickel, cuivre et zinc, entre les animaux complémentés et ceux ayant une nourriture standard donnée *ad libitum* ou amoindrie.

8.2. Dosages hormonaux

A. Sérotonine

Les teneurs moyennes en sérotonine des rats NF28 et Kao28 sont similaires après 28 jours de complémentation (Tableau 5-1).

B. Leptine

Les concentrations en leptine des rats NF14, Kao7 et Kao14 sont similaires. Celles des rats Kao28 sont supérieures à celles des rats NF14, Kao7 et Kao14 de respectivement 82,6, 102,2 et 72,2 % (Figure 81) (Tableau 5-2).

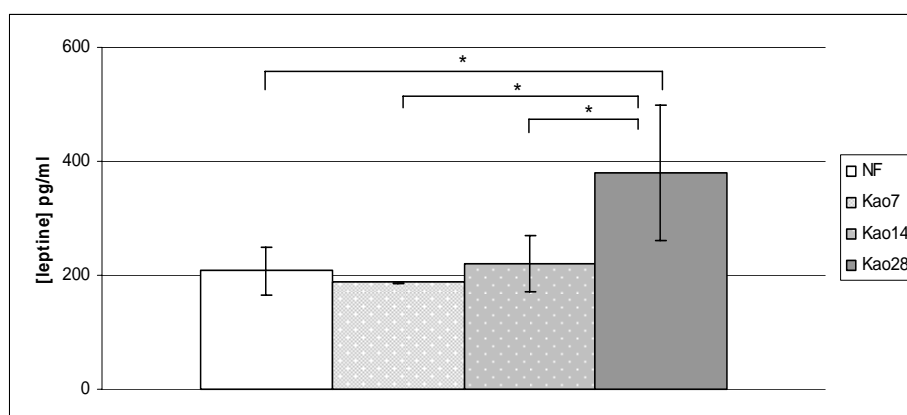


Figure 81. Concentration en leptine plasmatique des rats

DISCUSSION

9. DISCUSSION

Au cours de la discussion les points suivants seront successivement abordés :

- les relations entre les niveaux d'auto-complémentation et les régimes alimentaires auxquels sont soumis les animaux,
- le comportement des particules d'argile dans la lumière intestinale et au contact du mucus, et dans le cas de la kaolinite, la libération de l'aluminium après altérations des particules de kaolinite au cours du transit digestif,
- les modifications morphologiques induites dans la muqueuse intestinale et dans les cellules intestinales associées à une augmentation de l'absorption lipidique après ingestion d'argile,
- pour finir, les autres effets observés après ingestion d'argile et affectant l'intégrité des cellules qui composent l'épithélium intestinal.

9.1. Auto-complémentations en argile

Dans de nombreuses études antérieures sur l'effet d'une complémentation avec des argiles, les doses d'argiles sont fixées et imposées aux animaux, et les résultats sont interprétés en terme d'effets-doses (Quisenberry, 1968 ; Sakata, 1986 ; Southern et al., 1994; Tauqir et Nawaz, 2001). Dans cette étude, nous avons délibérément choisi de laisser les rats fixer eux-mêmes les quantités de kaolinite et de montmorillonite ingérées. Cette démarche visait à observer si les animaux consommaient l'argile spontanément, et en quelle quantité, en fonction du régime alimentaire subi.

A. Consommation d'argile

Au cours du temps, les quantités d'argile consommée par les animaux évoluent selon un schéma similaire dans toutes nos expériences. Elles sont importantes les premiers jours, puis diminuent jusqu'au septième jour pour se stabiliser ensuite jusqu'à la fin des expérimentations. Durant cette phase d'habituation, la variabilité inter-individuelle de consommation d'argile est beaucoup plus grande que la variabilité intra-individuelle (Reichardt et al., sous presse). Nous montrons donc que lors d'une complémentation libre, **le pourcentage moyen d'argile ingérée est remarquablement constant et de l'ordre de 5 % de la ration totale.**

Les pourcentages élevés d'argile ingérée durant les premiers jours d'expérimentation (entre 20 et 30 % de kaolinite dans la ration) sont probablement liés à un « **facteur découverte** » de l'argile par les animaux. Ces pourcentages ont été pris en compte dans le calcul des pourcentages totaux car des expériences antérieures montrent que des complémentations imposées élevées peuvent avoir des effets à court terme sur la physiologie intestinale (Goodlad et al., 1987, 1989). Une complémentation à dose imposée pourrait amplifier les réponses physiologiques observées et ne serait plus comparable à une complémentation volontaire.

Dans les expériences de réalimentation, en fin d'expérience, les animaux réalimentés *ad libitum* consomment presque deux fois plus de croquettes que les animaux restreints, mais les pourcentages d'argile par rapport à la ration totale sont similaires. Dans notre approche, les quantités consommées librement par les animaux sont d'une grande homogénéité, et les

résultats obtenus montrent que **la quantité d'argile ingérée dépend des quantités de nourriture ingérées, quel que soit le régime considéré**. Ainsi, les animaux semblent capables de définir un **niveau optimum de complémentation** constant, qui reflèterait une nécessité et/ou un bénéfice apportés par une ingestion spontanée et autorégulée en argile.

La consommation moyenne d'argile, fournie ici *ad libitum*, atteint 1 à 2 g par jour pour des rats de 300 à 400 g, ce qui représente 0,3 à 0,5 % de leur masse corporelle. Si nous extrapolons directement ces valeurs à l'homme, un individu pesant 70 kg consommerait alors 150 à 350 g d'argile par jour. Cette valeur est très supérieure aux valeurs recommandées dans le cadre de la consommation des médicaments à base d'argile (Chang et al., 2007) comme par exemple le SMECTA[®] (deux sachets de 2 g par jour en cas de troubles de la digestion chez un adulte soit 0,005 % de la masse corporelle). Il est toutefois remarquable de constater que dans des conditions de famine, comme récemment à Haïti (Klein et al., 2008), les habitants consomment des doses élevées d'argile, qui se rapprochent des quantités d'argile ingérées volontairement par les animaux dans nos expériences.

B. Réduction des apports alimentaires

Nous nous sommes également intéressés aux quantités de croquettes ingérées par les animaux dans les régimes alimentaires où la nourriture est donnée *ad libitum*. Lors de la réalimentation consécutive à un jeûne prolongé on observe habituellement une augmentation de la consommation alimentaire des animaux par rapport à celle d'avant jeûne (Cherel et Le Maho, 1991 ; Robin et al., 2008). Cette **hyperphagie** persiste après le retour à la masse initiale d'avant jeûne car les réserves lipidiques ne sont pas encore entièrement restaurées (Robin et al., 2008). Lors de l'expérience de réalimentation, les rats ont pour le dernier jour (dernier jour avant retour à la masse initiale d'avant jeûne) une consommation moyenne en croquettes de l'ordre de 130 à 140 % par rapport à celle des animaux de même masse soumis à un régime standard. Pour les rats ayant la possibilité d'ingérer de l'argile, la complémentation volontaire en kaolinite à hauteur de 5 % de la fraction solide ingérée entraîne une **diminution de 7 % de la prise de nourriture** sur toute la période de réalimentation. Des analyses protéomiques de la muqueuse jéjunale de ces rats ont révélé la surexpression de l'**apolipoprotéine A-IV** (Chaumande, thèse en cours) connue comme un

facteur de satiété (Tso et Liu, 2004). L'expression de ce facteur au cours de la réalimentation pourrait expliquer la réduction de la prise alimentaire observée.

Dans les différentes expériences de complémentation, que ce soit sur 7, 14 ou 28 jours, les rats complémentés ont des prises alimentaires similaires à celles des rats témoins. Pourtant, il est connu que des animaux recevant une ration alimentaire avec au moins 5 % de bentonite sur une période longue consomment moins de nourriture pour un gain de masse corporelle similaire (Huntington et al., 1977a, b ; Southern et al., 1994; Trckova et al., 2004). Ces données bibliographiques amènent à penser que l'ingestion d'argile pourrait aussi entraîner la **réduction de la prise alimentaire** des animaux lors d'un régime alimentaire standard. Cette réduction de la prise alimentaire pourrait être médiée par des peptides impliqués dans la régulation de la balance énergétique. En effet, après 28 jours de complémentation en kaolinite, les rats présentent des concentrations plasmatiques en **leptine** supérieures à celles des animaux témoins. Cette hormone peptidique est sécrétée majoritairement par le tissu adipeux après absorption de lipides, et agit sur le métabolisme énergétique et la régulation de la masse corporelle en diminuant la prise alimentaire et en stimulant la dépense énergétique (Houseknecht et al., 1998 ; Parrachini et al., 2005). De plus, un régime comprenant 30 % de kaolinite induit l'augmentation du **peptide YY** dans le plasma (Goodlad et al., 1987, 1989). Ce peptide est un facteur de satiété à court terme exprimé par l'intestin (Konturek et al., 2004). Sa présence inhibe la motricité gastrique et intestinale (Capasso et Izzo, 2008). Il serait intéressant dans l'avenir de quantifier l'expression de ce peptide au cours d'une complémentation volontaire en argile. Une autre hypothèse non exclusive permet d'expliquer la réduction de la prise alimentaire: l'ingestion d'argile pourrait s'accompagner d'une diminution du métabolisme basal des animaux, et permettrait ainsi de réduire la dépense énergétique. Il serait donc aussi très intéressant de quantifier la dépense énergétique des animaux complémentés.

Pour finir, il est à noter que, dans l'expérience 1b, les animaux complémentés en montmorillonite ont une consommation alimentaire moyenne supérieure à celle des rats témoins et des rats complémentés en kaolinite. Cette différence – contraire aux résultats obtenus avec doses imposées (Huntington et al., 1977a, b ; Southern et al., 1994; Trckova et al., 2004) – pourrait être expliquée par la grande variabilité de la consommation en croquettes des animaux constituant ce groupe, et présentant pourtant des pourcentages d'ingestion de montmorillonite homogènes.

C. Gain de masse corporelle

Dans toutes nos expériences, **les animaux ayant consommé volontairement et avec constance de l'ordre de 5 % de kaolinite ou de montmorillonite dans la ration quotidienne ont le même gain de masse que les animaux témoins.** Des écarts significatifs auraient peut-être pu être observés en prolongeant la durée de la complémentation ou en supprimant la variabilité intra-groupe au début des expériences de complémentation, comme cela a été pratiqué dans la dernière expérience avec restriction, et où les animaux complémentés sans restriction tendent à être plus lourds que les témoins pour une consommation en croquettes comparable. Des expériences antérieures de complémentation imposée menées sur la même durée de 14 jours montrent que 10 % de kaolinite dans l'alimentation entraînent un gain de masse significatif qui pourrait être du à une augmentation des réserves (Sakata, 1986).

La consommation volontaire de kaolinite avant ou pendant le jeûne ne modifie pas significativement **la durée des phases de jeûne** ainsi que **la perte de masse moyenne** jusqu'à l'entrée en phase III. De la même façon, elle ne modifie pas la **durée de réalimentation** jusqu'au retour à la masse initiale d'avant jeûne. Comme nous l'avons vu, l'ingestion d'argile diminue la prise alimentaire durant cette période. Ainsi, les animaux complémentés ont un gain de masse équivalent avec une consommation alimentaire moindre. Nous pouvons en conclure que la présence de particules d'argile dans la lumière intestinale **optimise l'efficacité alimentaire.** La complémentation durant une restriction alimentaire de 25 % ne modifie pas le gain de masse corporelle. Dans cette dernière expérience, nous observons une réponse métabolique particulière des animaux face à la restriction alimentaire, qu'ils soient complémentés ou non. Après environ 6 jours, les rats restreints qui ont perdu près de 15 g, commencent à regagner de la masse corporelle, arrivant après 14 jours de restriction à une masse comparable à celle du début de l'expérience. Des phénomènes similaires au cours d'une restriction ont été précédemment observés chez des animaux restreints à hauteur de 60 et 80 % avec un profil de perte et de gain de masse corporelle similaire (Hill et al., 1985 ; Hill et al., 1988).

Pour résumer les données obtenues sur l'auto-complémentation, nous pouvons dire que **l'ingestion de kaolinite diminue la prise alimentaire quand celle-ci est élevée**. La présence de particules d'argile dans la lumière intestinale optimise la digestibilité de la ration alimentaire et entraîne l'augmentation de l'absorption (Habold et al., sous presse). Cette absorption accrue est accompagnée d'une augmentation de l'expression de facteurs plasmatiques régulant la prise alimentaires et certains phénomènes digestifs. Le degré de réduction de la prise alimentaire dépendrait donc du niveau d'ingestion volontaire d'argile atteint, qui est probablement lié aux capacités digestives de chaque individu. **La consommation en argile serait ainsi liée aux capacités digestives des animaux et 5 % de complémentation représenterait un niveau optimum des effets positifs apportés par les argiles dans la digestion et l'assimilation**. Ce pourcentage pourrait refléter l'établissement d'une balance entre les effets positifs et des effets négatifs liés à la présence des particules d'argiles.

D. Effet bénéfique au niveau intestinal

Au début de chaque expérience, les rats augmentent leur consommation en argile quand ils sont mis sur grille. Or la consommation d'argile, et notamment de kaolinite, est connue pour soulager les **troubles digestifs** et réduire les états de **malaise**, auxquels peuvent être associés les phénomènes de stress (Takeda et al., 1993 ; Yamamoto et al., 2002 ; Andrews et al., 2006 ; Cabezos et al., 2008). Le maintien sur grille conduit à un stress chronique d'intensité moyenne associé à une élévation des taux de corticostérone et à des modifications d'activité de la sérotonine (Heidbreder et al., 2000). Ce stress a pu être évalué indirectement par la consommation de kaolinite. Au moment où les rats découvrent l'argile, ils mangent significativement moins de kaolinite s'ils ont été adaptés à l'inconfort causé par la grille les quelques jours précédents, que s'ils découvrent l'argile et la grille en même temps. **L'ingestion de kaolinite réduit leur sensation de malaise**.

Nos expériences de dosage de la **sérotonine**, une hormone liée au stress, ne montre pas de différence significative entre des animaux complémentés pendant 28 jours et des animaux témoins. Il est possible que la consommation de kaolinite ait modifié la concentration de sérotonine rapidement après le début de l'expérience, mais cette modification ne semble plus visible après quatre semaines de complémentation. La sérotonine est également connue pour

inhiber la prise alimentaire et hydrique (Xu et Chen, 2007). Des prélèvements réguliers de sang juste avant et après ingestion de kaolinite, permettraient de doser les concentrations de sérotonine plasmatique, et de voir si l'expression de cette hormone habituellement associée aux phénomènes de malaise peut être modifiée par la complémentation.

En résumé:

- **L'ingestion de kaolinite diminue la prise alimentaire quand celle-ci est élevée et optimise la digestibilité de la ration alimentaire entraînant l'augmentation de l'absorption lipidique** (Habold et al., sous presse).
- Cette absorption accrue est accompagnée d'une **augmentation de l'expression de facteurs plasmatiques qui entraînent la régulation de la prise alimentaire et des phénomènes digestifs. La prise alimentaire dépendrait donc du niveau d'ingestion volontaire d'argile et est probablement lié aux capacités digestives de chaque individu.**
- **La consommation en argile serait ainsi liée aux capacités digestives des animaux et 5 % de complémentation représenterait un optimum dans les effets apportés par les argiles dans la digestion et l'assimilation.** Ce pourcentage pourrait être dû à l'établissement d'une balance entre les effets positifs et négatifs liés à la présence des particules d'argiles.
- **Enfin, la complémentation durant le jeûne ou la réalimentation ne modifie pas la durée des traitements et semble optimiser la digestibilité de la nourriture ingérée.**

9.2. Particules d'argile au contact du mucus intestinal

Un point important et novateur de notre travail est l'observation directe des argiles à l'interface avec la paroi intestinale. Deux aspects majeurs ont été considérés : l'interaction des particules d'argile avec le mucus et le passage potentiel d'aluminium à travers la muqueuse après ingestion de kaolinite.

A. Interactions argiles - mucus

Les surfaces des villosités intestinales des rats complémentés en **kaolinite** pendant 28 jours apparaissent en ESEM partiellement couvertes par des amas de particules d'argile incluses dans le **mucus**. En revanche, dans le cas d'une complémentation en **montmorillonite**, l'argile est répartie de façon plus diffuse dans le mucus. Dans les deux cas, une partie des amas de kaolinite et de montmorillonite contiennent des particules résiduelles de nourriture.

Dans le cas de la complémentation en kaolinite, les analyses en MET montrent de nombreuses particules de **kaolinite** de très petite taille (de 100 à 500 nm) piégées à l'intérieur du mucus. Ce dernier se présente sous deux formes: un gel insoluble dans l'eau (30-450 nm d'épaisseur) adhérant à la muqueuse et une couche visqueuse hydrosoluble qui recouvre le gel. Le principal composant du mucus est la mucine, responsable de ses propriétés viscoélastiques et gélifiantes. La polymérisation des monomères de mucine se fait via des liaisons covalentes, par l'intermédiaire de ponts disulfures, et via des liaisons non-covalentes hydrophobes entre les zones peptidiques non-glycosylées (Varum et al., 2008). Cette polymérisation contribue à former un gel par l'enchevêtrement ou l'interdigitation des molécules de mucine fortement hydratées. La structure polymérique de la mucine est capitale pour la formation du gel puisque la protéolyse des peptides de mucine non-glycosylées ou la rupture chimique des ponts disulfures libère des monomères de glycoprotéines qui ne gélifient pas dans des conditions physiologiques normales (Varum et al., 2008). L'hydratation du mucus est donc essentielle pour son maintien. En raison de leur grande capacité d'absorption d'eau, il semble probable que **la présence d'argile affecte l'organisation du mucus**. En ce sens, il est connu que l'ingestion d'argile diminue la solubilité du mucus augmentant ainsi sa viscosité (Droy-Lefaix et Tateo, 2006). Des études plus détaillées permettraient de caractériser les interactions réelles entre les argiles et le mucus.

Les particules de kaolinite retrouvées dans les fèces et observées par ESEM présentent des signes d'altération, avec des bords arrondis et érodés par comparaison avec les bords réguliers et hexagonaux des particules témoins non ingérées. **Ces altérations reflèteraient l'effet du contact direct avec des sécrétions gastriques acides ou biliaires basiques, et/ou d'une action mécanique exercée par le tube digestif lors du transit du bol alimentaire.** Comme nos résultats l'ont montré, une faible proportion des particules de kaolinite s'altère et permet

la libération d'aluminium, un élément constitutif de cette argile, et très connu par ailleurs pour sa toxicité cellulaire.

B. Libération et absorption d'aluminium

Les microanalyses chimiques **EDX** montrent des traces d'**aluminium** dans le mucus des rats complémentés en **kaolinite** pendant 28 jours (Reichardt et al., sous presse). Par ailleurs, les teneurs en aluminium des rats ayant consommé de la **montmorillonite** ne sont pas différentes de celles des animaux témoins. **Une partie de l'aluminium issu de la kaolinite semble avoir été libéré et aurait diffusé dans le mucus environnant.** La persistance de reliques minérales enrichies en silicium indiquerait que la couche tétraédrique siliceuse de la kaolinite résiste mieux à la dissolution. De plus, les analyses complémentaires menées par absorption atomique sur du sang et du foie, montre une augmentation de la teneur en aluminium du sang et du foie des animaux complémentés en kaolinite pendant **28 jours**. Par ailleurs, les analyses par spectrométrie de masse sur les lyophilisats des animaux réalimentés montrent également que les teneurs en aluminium sont plus élevées chez les animaux complémentés (Chaumande, thèse en cours). Ces résultats concordants suggèrent que **l'aluminium apporté par les argiles est absorbé par la muqueuse intestinale et gagne ensuite la circulation générale et des organes de stockage.**

La présence d'aluminium dans le mucus et son absorption par la muqueuse intestinale témoignent de l'**altération mécanique et/ou chimique des particules de kaolinite** lors du transit digestif. Il est connu que des argiles soumises *in vitro* à des **attaques acides** peuvent libérer de l'aluminium et du silicium respectivement à partir des couches octaédriques et tétraédriques (Cabrera et Talibudeen, 1978, 1979). Les différents pH rencontrés le long du tube digestif, entre l'acidité des sécrétions gastriques et la basicité de la bile dans l'intestin grêle (due aux ions HCO_3^- déversés dans l'intestin par le pancréas pour neutraliser l'acidité du chyme provenant de l'estomac) pourraient expliquer l'altération partielle des particules de kaolinite. L'augmentation de pH dans l'intestin, de 2 à 3 à l'entrée du duodénum à 8 à la fin de l'iléon, entraîne la **précipitation** de l'aluminium dissous, neutralisé par les sécrétions pancréatiques et biliaires sous différentes formes tel l'hydroxyde d'aluminium (Weberg et

Berstad, 1986 ; Cochran et al., 1993 ; Cunat et al., 2000). Cependant, l'aluminium lié aux molécules organiques des sucs gastriques peut rester soluble dans le milieu alcalin de l'intestin grêle et une petite quantité de cet aluminium peut être absorbée par la paroi intestinale (Weberg et Berstad, 1986 ; Powell et Thompson, 1993 ; Reiber et al., 1995 ; Kaehny et al., 1997 ; Cunat et al., 2000). La plus grande partie de l'aluminium insoluble est éliminée avec le reste du bol alimentaire (Weberg et Berstad, 1986 ; Powell et Thompson, 1993). Chez l'animal, selon la forme ionique considérée, 0,7 à 2,18 % des quantités d'aluminium présent pourraient ainsi être absorbées (Pichard et al., 2005).

L'**absorption tissulaire** d'aluminium par le jéjunum après adhérence aux glycoprotéines du mucus est bien connue (Powell et al., 1994 ; Walton et al., 1995 ; Whitehead et al., 1997 ; Orihuela et al., 2005). La présence de particules d'argiles dans le mucus pourrait induire une déshydratation localisée, ce qui entraîne la rupture chimique des ponts disulfures du gel et désorganise le mucus (Varum et al., 2008). L'aluminium peut se fixer alors sur les glycoprotéines libérées. Cette fixation a pour effet : (1) d'augmenter l'absorption tissulaire de l'aluminium par perméation paracellulaire passive (Powell et al., 1994 ; Whitehead et al., 1997 ; Cunat et al., 2000), et (2) d'entraîner une réduction importante de la capacité de polymérisation des molécules de mucine qui composent le gel et donc la réduction des capacités de protection du mucus (Ballance et al., 2002).

Une fois absorbé, l'aluminium passe dans la **circulation générale** et se fixe alors à des protéines de transport comme la transferrine et l'albumine (Cochran et al., 1993 ; Powell et al., 1994 ; Winklhofer et al., 2000). La fixation de l'aluminium à la transferrine conduit à une anémie (Powell et al., 1994 ; Winklhofer et al., 2000). L'absorption de cet élément après ingestion d'argile est généralement invoquée pour expliquer les phénomènes de carence ferrique décrits chez les individus géophages (Halsted, 1968 ; Geissler et al., 1998b).

Nous avons également vu qu'après 28 jours de complémentation en kaolinite, **les teneurs en aluminium dans le foie des animaux sont augmentées**. Cet organe, ainsi que le cerveau, les os, les muscles, et les reins sont les principaux lieux de stockage de cet élément (Van der Voet et al., 1992 ; Pichard et al., 2005). Les masses minérales élevées obtenues pour les animaux réalimentés pourraient refléter une augmentation du stockage de cet élément. Le foie est capable de sécréter dans la bile de petites quantités d'aluminium absorbé, et est suppléé par les reins quand ses capacités de sécrétion sont surpassées (Powell et al., 1994 ; Sutherland et Greger, 1997 ; Mahieu et al., 2005). L'absence de différences significatives obtenues dans notre étude sur les concentrations en aluminium dans les reins, le cerveau et le crâne entre les

animaux témoins et complémentés illustrerait le caractère hétérogène de la fixation de cet élément. Certains rats montrent des concentrations élevées dans le cerveau ou le crâne – jamais dans les deux. Il semblerait que, quand le foie ne parvient plus à stocker et éliminer l'aluminium, cet élément se fixe préférentiellement dans le cerveau ou dans l'os du crâne. Normalement, l'élimination de cet élément de l'organisme se fait par l'intermédiaire des fèces et des urines (Cunat et al., 2000 ; Mahieu et al., 2005).

La **toxicité** de l'aluminium est maintenant bien connue chez les animaux et se manifeste avec de faibles concentrations (Powell et al., 1994 ; Walton, 2007). Son stockage par les cellules du cerveau conduit à des dégénérescences similaires à celles causées par la maladie d'Alzheimer (Perl, 1985; Golub et al., 1989 ; Pichard et al., 2005 ; Walton, 2007). Au niveau osseux, sa présence perturbe le cycle de formation et de résorption du squelette (Martinez et al., 1991; Jablonski et al., 1996). La **dose létale 50** (DL50: dose nécessaire pour entraîner la mort de 50 % d'une population) de l'aluminium varie chez des rats Sprague-Dowley de 162 à 730 mg/kg/j en fonction de la forme sous laquelle cet élément est donné (Llobet et al., 1987). Par une approximation simple, nous pouvons estimer qu'un rat (environ 400 g) ingérant 1 g de kaolinite (soit en masse 20 % d'aluminium) consommerait environ 200 mg d'aluminium soit 500 mg/kg/j. Si tout l'aluminium circulant était fixé – ce qui est peu probable –, nous serions dans la frange supérieure de la DL50. Le pourcentage d'aluminium libéré par la kaolinite et fixé semble être assez faible au vu du différentiel des teneurs sanguines de cet élément chez les animaux complémentés pendant 28 jours et chez les animaux témoins. En effet, les concentrations mesurées, illustrant les absorptions d'aluminium sur les dernières heures, ne diffèrent que de 2 µg/g de sang, ce qui, ramené à l'ensemble du volume sanguin (considérant qu'un rat possède ≈ 20 ml de sang), représenterait 40 µg, soit 100 µg/kg/j ou 0,1 mg/kg/j alors que la **dose sans effet nocif observé** (DSENO) reconnue chez le rat est de 0,6 mg/kg/j (Pichard et al., 2005). Bien qu'un phénomène de clairance sanguine et de grandes capacités de fixation puissent expliquer les faibles teneurs mesurées ici, il semble que **l'absorption d'aluminium associée à l'ingestion de kaolinite est faible.**

Dans nos expériences, les teneurs en aluminium des rats complémentés en **montmorillonite** ne sont pas différentes de celles des animaux témoins. Deux hypothèses non exclusives fondées sur les capacités de liaison des particules de smectites avec les glycoprotéines du mucus peuvent être formulées ici.

- Les différents pH rencontrés par les particules argileuses entre l'estomac et l'intestin ne dégraderaient pas les couches octaédriques alumineuses de la structure TOT de la montmorillonite, ne permettant pas une libération d'aluminium comme dans le cas de la structure TO de la kaolinite. *In vitro* pourtant, des attaques acides de la montmorillonite libèrent plus facilement l'aluminium comparativement à la kaolinite (Cabrera et Talibudeen, 1978, 1979). Il se pourrait que les complexes formés avec des glycoprotéines du mucus protègent les feuillets de montmorillonite et limiteraient ainsi l'action des sécrétions acides.
- Les analyses ESEM/EDX montrent la présence d'aluminium dans le mucus environnant les particules de montmorillonite. Mais en augmentant le degré de fixation entre les glycoprotéines qui le composent, ces particules forment une barrière résistante aux agressions variées (Droy-Lefaix et al., 1985 ; Moré et al., 1987 ; Gwozdziński et al., 1997 ; Xia et al., 2004 ; Droy-Lefaix et Tateo, 2006 ; Chang et al., 2007). La montmorillonite a un pouvoir de dissociation interfeuillets supérieur à celui de la kaolinite et **offre ainsi une plus grande surface d'échange permettant un recouvrement intestinal plus important**. Cette barrière empêcherait l'absorption de l'aluminium libre. Les smectites ingérées retardent l'absorption de drogues basiques et n'altèrent pas la cinétique d'absorption de drogues acides (Albengres et al., 1985). Ceci expliquerait le fait que la concentration d'aluminium dans les tissus de rats complétés ne soit pas différente de celle des animaux témoins. La même hypothèse sur l'effet barrière expliquerait que la concentration d'aluminium dans le sang tende à être inférieure à celle des animaux témoins, en empêchant l'absorption de l'aluminium amené par la nourriture et/ou l'eau de boisson, et sa fixation sur la transferrine. Ceci expliquerait que l'ingestion de smectite s'accompagne d'une augmentation de la teneur sanguine en fer (Grosicki et Kowalski, 2003)

La présence conjointe dans la lumière intestinale de nourriture mêlée aux particules de kaolinite pourrait agir à deux niveaux. La nourriture pourrait (1) **diminuer la dégradation** des particules d'argile en les protégeant des attaques acides, et/ou (2) exercer **un effet tampon** et ainsi entraîner la formation de complexes avec l'aluminium (Druëke, 2002). Ainsi, l'alimentation peut réduire l'absorption de l'aluminium en formant des composés insolubles avec des phosphates et des silicates (Pichard et al., 2005). La mesure des teneurs en aluminium dans différents tissus après une complémentation lors du jeûne, et donc en absence de nourriture et sans interaction possible avec celle-ci, pourrait permettre de répondre en partie à ces interrogations. Il serait également intéressant d'arriver à estimer plus précisément

le pourcentage d'aluminium présent dans la lumière intestinale et provenant des particules de kaolinite ingérées, en utilisant par exemple un tube digestif recréé *in vitro* (Dominy et al., 2004), ou de quantifier les teneurs en aluminium présentes dans les fèces et les urines des animaux, en connaissant avec précision les quantités d'aluminium ingérées (par exemple en utilisant des argiles de synthèse ce qui permettrait d'estimer les pourcentages d'aluminium respectivement libérés par l'argile et absorbés par la muqueuse après ingestion).

Enfin, il serait intéressant de doser également le **silicium**. L'analyse des *block-faces* de villosités a montré que le silicium était présent à l'intérieur des entérocytes après complémentation en kaolinite, bien que sa teneur ne soit pas significativement plus élevée dans les lyophilisats des animaux réalimentés avec complémentation. Les techniques de dosage que nous avons utilisées n'ont pas permis de doser le silicium présent dans le sang et les organes des animaux. Chez l'Homme, une complémentation pendant 14 jours avec un aluminosilicate composé de Mg, Ca et Na montre l'élévation de la concentration en silicium dans le sang sans augmentation de celle de l'aluminium (Mauras et al., 1983). Le silicium pourrait être l'antidote naturel à l'élément toxique qu'est l'aluminium (Refitt et al., 1999), en créant localement des aluminosilicates métastables éliminés dans les fèces qui limiteraient la toxicité de l'aluminium (Powell et Thompson, 1993).

En résumé :

- **Les particules de kaolinite peuvent être altérées par les sécrétions gastriques et ces attaques entraîneraient la libération d'aluminium.**
- **Une absorption partielle de cet élément toxique se fait au niveau intestinal et pourrait constituer un effet négatif lié à l'ingestion de kaolinite, mais serait très modéré.**

9.3. Rôle des argiles dans la physiologie intestinale

A. Effets sur la digestibilité

Un autre aspect important de l'ingestion d'argiles est l'**accroissement de l'efficacité alimentaire**. Des expériences menées au laboratoire en parallèle de cette thèse (Habold et al., sous presse) ont en effet montré que:

- (1) l'absorption des sucres n'est pas modifiée par la présence de particules de kaolinite dans la lumière intestinale, bien qu'après 28 jours de complémentation en kaolinite, l'expression de deux transporteurs membranaires des sucres soit augmentée ;
- (2) la présence de kaolinite augmente l'absorption des acides gras libres non estérifiés.

La modification de l'absorption des lipides pourrait être expliquée par au moins trois effets connus des argiles.

- (1) Les argiles assèchent le bol alimentaire en absorbant l'eau qu'il contient, ce qui entraîne un **ralentissement du transit intestinal** et donc une augmentation de l'absorption métabolique avec une meilleure digestibilité de la ration alimentaire et une meilleure assimilation des nutriments (Castaing et Noblet, 1997; Tauqir et Nawaz, 2001, Habold et al., sous presse). En effet, un ralentissement du transit intestinal est habituellement associé à une augmentation linéaire de l'absorption des nutriments (Huge et al., 1995). L'absorption d'eau par les argiles entraînerait l'augmentation de la concentration des nutriments dans la lumière intestinale, induisant l'activation des chémorécepteurs présents dans l'épithélium et déclenchant un ralentissement de la motricité intestinale (Schwartz et Moran, 1998 ; Xing et Chen, 2004 ; Berthoud, 2008 ; Capasso et Izzo, 2008). La présence de kaolinite dans la ration alimentaire induit également une réduction du remplissage gastrique (Habold et al., sous presse). La fixation de lipides sur des récepteurs présents dans la lumière intestinale induit une inhibition de ce remplissage et donc une réduction de l'entrée des nutriments dans l'intestin (Xing et Chen, 2004 ; Capasso et Izzo, 2008).
- (2) Il est connu que les argiles ont la propriété de **fixer des composés organiques** à leur surface (Khalil et Abdelhakim, 2002). Les observations en MEB montrent la présence de grains d'amidons au contact des particules de kaolinite et de montmorillonite. En solution, cette dernière facilite la formation de micelles lipidiques: la surface d'échange élevée de

cette argile permettrait de fixer des acides gras augmentant ainsi son pouvoir organophile (Khalil et Abdelhakim, 2002 ; Hanczyc et al., 2003). Il a été également montré que le D-glucose se fixe de manière stéréospécifique à la bentonite (Bondy et Harrington, 1979). La fixation par un lien physico-chimique des aliments sur les particules d'argile pourrait faciliter le contact entre ces molécules organiques et les enzymes digestives.

(3) Les argiles, par leurs pouvoirs catalytiques, augmentent l'action des enzymes présentes dans la lumière intestinale et modifient probablement l'activité de la **lipase pancréatique** et/ou des sécrétions enzymatiques pancréatiques, comme des premières données le laisseraient supposer (Habold et al., sous presse). La lipase hydrolyse les liaisons esters des triglycérides liant les acides gras au glycérol, ce qui va accroître la présence d'acide gras libres dans la lumière intestinale.

Après chaque repas, l'essentiel des triglycérides est digéré dans la lumière intestinale par la lipase pancréatique au contact des acides biliaires, et 80 à 90 % des acides gras libérés sont absorbés. Le rendement de la lipolyse n'est donc pas total, une petite partie des lipides est éliminée dans les fèces (Friedman et Nylund, 1980). Dans notre étude, les animaux ingèrent des croquettes contenant 4,3 % de lipides et, bien que cette teneur soit faible, il est probable qu'une petite partie de ces lipides ne soit pas absorbée. **Les particules d'argile en ralentissant le transit intestinal et en augmentant l'activité de la lipase pancréatique, pourraient ainsi accroître la lipolyse et la cinétique d'absorption des acides gras.** Si la lipolyse est augmentée par la présence de particules d'argile dans la lumière intestinale, alors la proportion totale de lipides dans les fèces devrait être diminuée voire inexistante. Il serait donc très intéressant d'analyser les fèces.

B. Effets sur l'absorption lipidique

Après 7 jours de complémentation, la concentration des triglycérides plasmatiques, reflet de l'absorption lipidique, est augmentée (Habold et al., sous presse). Ainsi, un échantillon d'intestin, observé lors de la déshydratation partielle subie dans la chambre du microscope électronique à balayage en mode environnemental (ESEM), montre de façon dynamique l'extrusion de nombreuses gouttes d'un fluide riche en carbone, le principal composant des lipides. Ce phénomène n'est observé que chez les animaux complémentés et pourrait refléter un enrichissement lipidique au sein des villosités. Par ailleurs, de nombreuses et volumineuses

gouttelettes lipidiques sont observées en MET chez les animaux complémentés en argile, dans la partie apicale des entérocytes et autour de l'appareil de Golgi. Ces gouttelettes lipidiques forment ensuite des **chylomicrons**.

Un régime enrichi en lipides pendant 14 jours stimule la capacité des entérocytes isolés à synthétiser et sécréter des chylomicrons (Cartwright et Higgins, 1999). Pourtant, ces deux étapes sont limitantes dans l'absorption des acides gras libres, conduisant à une accumulation physiologique de lipides dans la muqueuse intestinale après perfusion de triglycérides dans la lumière intestinale (Wu et al., 1975). Une complémentation en kaolinite pendant 28 jours conduit à une augmentation des expressions de deux protéines de fixation des acides gras, la **FABP** et la **FATP**, dans le cytosol des entérocytes (Habold et al., sous presse), qui vont empêcher la sortie des lipides dans la lumière intestinale contre leurs gradients de concentration. Le fait que la synthèse et/ou la sécrétion des chylomicrons soient des étapes limitantes, et que les expressions des protéines de fixation des lipides soient augmentées, pourrait expliquer **les accumulations de gouttelettes lipidiques observées dans les entérocytes** des animaux complémentés.

Les animaux complémentés lors de la réalimentation ont une masse lipidique équivalente à celle des rats réalimentés témoins, avec pourtant une prise alimentaire diminuée. Ces animaux présentent une augmentation d'expression de deux **apolipoprotéines**, l'Apo-AI et l'Apo-AIV, associées aux chylomicrons. Cette surexpression augmente chez les rats réalimentés et complémentés d'un facteur 1,5 et 2 par rapport aux rats réalimentés témoins ou restreints, respectivement (Chaumande, thèse en cours). Cette surexpression traduit **chez les rats complémentés, l'augmentation significative du nombre de chylomicrons consécutive à l'augmentation de l'absorption des acides gras**. Deux autres hypothèses non exclusives existent par ailleurs. L'ingestion d'argile augmenterait : (1) la formation des réserves lipidiques de l'animal, et/ou (2) la production lipidique endogène spécifique aux derniers jours d'une réalimentation totale (Robin et al., 2008). Dans le cas des rats réalimentés avec uniquement la quantité de croquettes ingérée par les animaux réalimentés et complémentés (réduction des apports alimentaires de 7 %), les masses lipidiques sont plus importantes de 11,7 % pour une durée de réalimentation plus longue de 11 % par rapport aux animaux réalimentés et complémentés. Sans kaolinite, la lipolyse serait moins importante et les animaux mettraient plus de temps à revenir à leurs masses initiales d'avant jeûne, mais ce

temps supplémentaire leur permettrait de reconstituer des réserves lipidiques plus importantes.

Les lipoprotéines **passent ensuite dans les espaces intercellulaires** au niveau médian des entérocytes avant de migrer vers la lame basale. En fonction de son importance, cette migration des lipoprotéines entraîne l'élargissement des espaces extracellulaires à la base des villosités intestinales principalement lors de l'expérience de réalimentation. Dans nos expériences, deux types d'élargissements peuvent être distingués au dessus du chorion, sous les entérocytes du sommet des villosités: une **zone d'étirement intracellulaire** au cytoplasme peu dense, et un **élargissement des espaces intercellulaires basolatéraux**.

1) Étirements du cytoplasme

L'allongement intracellulaire basal n'est pas une conséquence spécifique liée à l'ingestion d'argile, car il est observé chez tous les animaux réalimentés, complémentés et témoins. Il est caractérisé par un cytoplasme peu dense aux électrons, et par l'absence d'organites cellulaires (mitochondries, lysosomes, ...). Ces zones d'étirement pourraient résulter de la **rétraction du chorion** à l'intérieur des villosités ; phénomène déjà observé et décrit chez des rats en phase II de jeûne (Dunel-Erb et al., 2001). Ceux-ci présentent des allongements intracellulaires semblables attribués à un détachement des cellules lors de la rétraction de la *lamina propria*, consécutive à la rétraction du chorion. Les villosités des animaux restreints avec ou sans complémentation présentent la même morphologie que celles des rats en phase II, avec réduction de taille et présence du même type d'allongement intracellulaire à la base des entérocytes, qui sont longs, fins et courbés vers le sommet avec des membranes invaginées. Ces courbures, visibles nettement sur les entérocytes situés juste sous le sommet des villosités, pourraient témoigner de la rétraction de la *lamina propria* consécutive à la rétraction du chorion. Les bases des cellules seraient ainsi allongées, ce qui expliquerait l'étirement visible des entérocytes.

Les animaux complémentés pendant 28 jours et réalimentés avec ou sans complémentation présentent ces mêmes zones d'étirement basal intracellulaire. Contrairement aux animaux à jeun ou restreints, ces zones d'étirement sont présentes à la base des cellules qui contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques. L'étirement des cellules serait donc

dans ce cas consécutif à une absorption lipidique massive par les entérocytes. Une hypothèse que nous pouvons faire est que, **face à une absorption lipidique très élevée comme dans la réalimentation, le chorion pourrait se rétracter afin de réduire l'afflux de lipides vers le chylifère, et sa rétraction entraînerait la formation de ces allongements comme chez les animaux restreints.** Il serait intéressant de marquer à l'aide d'anticorps spécifiques les vaisseaux lymphatiques afin de visualiser la cinétique de ce phénomène.

Ces zones d'étirement intracellulaire sont délimitées par de longues membranes latérales souples, qui leurs confèrent une grande **flexibilité**. Leur présence augmente la longueur des cellules et de ce fait la largeur des villosités. La séparation existant entre ces zones d'extensions et le reste de la cellule est constituée par un **toron de microfilaments d'actine** comme le montrent les analyses en microscopie confocale. Ces filaments retiendraient les organites au niveau apical en délimitant une zone basale très flexible. L'actine est un composant essentiel dans le soutien des membranes cellulaires (Kukulies et al., 1984), et les allongements de cellule seraient permis par le déplacement de cette structure cytosquelettique. Ils permettraient également de maintenir l'adhérence cellulaire en cas de rétraction du chorion et de la *lamina propria*.

Pour finir, il a pu être observé chez les rats restreints, dans les bases des entérocytes, la présence de composants qui semblent être des vésicules de réticulum endoplasmique lisse. Le REL est connu pour jouer un rôle dans la synthèse des lipides, notamment des phospholipides membranaires et des stéroïdes, l'élimination de produits toxiques de la cellule (alcool, médicament, ...), et le stockage de lipoprotéines (Cau et Seïte, 1997). Plus particulièrement dans les cellules intestinales, il joue un rôle dans la fabrication et le transport des lipides.

2) Espaces extracellulaires

Les zones basales d'élargissement extracellulaire, ou **espaces de Grünhagen**, sont un site de passage des chylomicrons (Friedman et Nylund, 1980). Dans nos expériences, une majorité des animaux complémentés en kaolinite ou en montmorillonite présentaient des espaces de Grünhagen élargis. Après avoir été absorbés, les lipides migrent vers ces espaces en profitant des flux hydriques absorbants, pour constituer des espaces remplis de lipides et d'eau (Tso et

Balint, 1986). Ainsi, l'abondance de chylomicrons après ingestion régulière de kaolinite reflèterait une augmentation de l'absorption lipidique passive.

Dans le cas d'une réalimentation, l'élargissement de ces deux espaces, qui viennent d'être décrits dans cette étude, est concomittant. **L'augmentation de l'absorption lipidique passive en présence d'argile dans la lumière intestinale pourrait induire à la fois l'élargissement des espaces de Grünhagen et la rétraction du chorion des villosités**, ce qui provoquerait la formation des zones d'étirements intracellulaires. L'élargissement des espaces de Grünhagen lors de passages importants de lipoprotéines écraserait les bases allongées des cellules, ce qui est visible chez les animaux réalimentés.

C. Adaptation de la bordure en brosse à l'absorption lipidique

Nous avons vu dans notre étude que **l'ingestion régulière d'argile ne modifie pas sensiblement la taille des villosités**. En revanche, des complémentations en kaolinite et en montmorillonite entraînent le raccourcissement des microvillosités sans pour autant entraîner de modification de leurs surfaces et de leurs volumes. **La complémentation induirait un raccourcissement et un élargissement des microvillosités sans modifier leur volume moyen**. L'intestin peut moduler l'assimilation en adaptant sa morphologie en fonction des besoins de l'organisme. Ainsi, la variation dynamique de la taille des villosités intestinales et des microvillosités cellulaires est connue comme un moyen flexible de moduler l'absorption des graisses (Altmann et Leblond, 1970 ; Goodlad et al., 1989 ; Goda et Takase, 1994). **Les entérocytes, dont les largeurs ne varient pas, réduiraient par ce mécanisme leur surface d'absorption en réduisant la surface des microvillosités afin de diminuer localement la surface d'échange face à une absorption lipidique passive importante**.

L'ingestion régulière d'argile ne modifie pas la taille des villosités. Pourtant, il est connu que l'optimisation de la physiologie intestinale, permise dans notre cas par la présence d'argile, est associée à une augmentation relative de l'absorption lipidique et affecte la morphologie intestinale en entraînant une augmentation (1) de la prolifération cellulaire qui pourrait conduire à augmenter la taille des villosités intestinales et donc leur surface d'absorption (Thomson et al., 1994 ; Petit et al., 2007), et/ou (2) de l'expression de gènes

jouant un rôle important dans l'absorption et la fixation des acides gras (FATP4, FAT/CD36, FABP) (Petit et al., 2007). En revanche, les villosités sont plus grandes après la réalimentation, ceci avec ou sans complémentation, ce qui est en contradiction avec une étude précédente dans laquelle les villosités des rats réalimentés avaient la même taille que celles des animaux témoins à la fin de la réalimentation (Dunel-Erb et al., 2001). L'ingestion d'un régime hyperlipidique – auquel la réalimentation (où les proportions de nourriture ingérées sont plus importantes) pourrait être assimilée – entraîne l'agrandissement des villosités intestinales (Goda et Takase, 1994).

Nous avons pu observer que **l'ingestion de 5 % d'argile induit une réduction de la longueur des microvillosités**, observée significativement après 14 jours d'ingestion de kaolinite. Ce phénomène posséderait donc une cinétique lente. Or, un apport en montmorillonite enrichie en cuivre à raison de 0,15 % à 0,2 % dans la ration alimentaire pendant 40 à 50 jours augmente la taille des microvillosités ainsi que les villosités elles-mêmes chez différentes espèces (poisson, porc et poule) (Xia et al., 2004; Hu et al., 2007 ; Ma et Guo, 2008). Les différences de morphologie observées entre nos résultats et ceux précédemment décrits pourraient s'expliquer (1) par la présence de cuivre dans la complémentation, et/ou (2) par la nature des complémentations. En effet, dans les études citées, les pourcentages d'argiles ajoutés dans la nourriture sont peu importants et ces faibles complémentations pourraient ne pas être suffisantes pour optimiser l'efficacité alimentaire et entraîner des modifications morphologiques comparables aux nôtres.

La diminution de taille des microvillosités peut se faire par la dépolymérisation des filaments d'actine qui les constituent et/ou par la rétraction de ces filaments entraînés par la rétraction du réseau terminal d'actine (Sohma, 1983 ; Coudrier et al., 1988 ; Waheed et Gupta, 1997). Après 14 jours de complémentation en kaolinite, la distance moyenne entre ce réseau et la membrane apicale est plus importante que celle mesurée chez les animaux témoins. Cette différence n'est pas retrouvée après 7 ou 28 jours de complémentation, illustrant le fait que ce réseau se serait déplacé temporairement après 14 jours de complémentation avant de reprendre une configuration normale. En revanche, c'est la réduction de longueur des microfilaments d'actine qui expliquerait la taille réduite des microvillosités après 28 jours de complémentation (Figure 82).

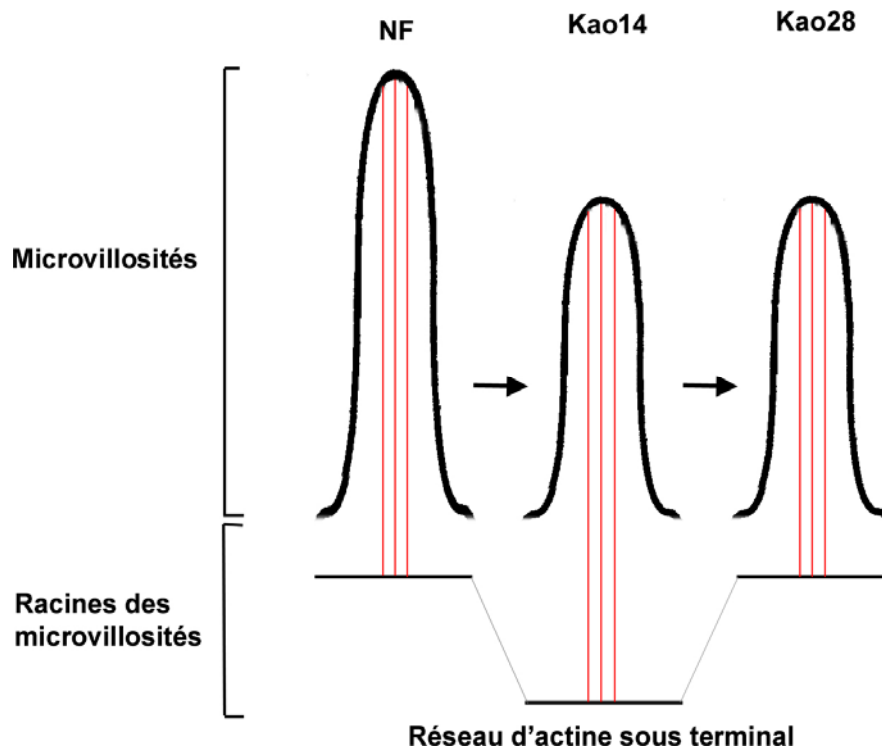


Figure 82. Schéma représentant la cinétique de réduction des microvillosités lors de la complémentation sur le long terme

Ainsi, la diminution de taille des microvillosités face à une absorption lipidique importante serait liée à une rétraction du réseau d'actine sous-membranaire dans un premier temps suivie par une dépolymérisation des filaments d'actine. La mise en place successive de ces mécanismes montre l'adaptation de la bordure en brosse face à une absorption lipidique augmentée lors d'une ingestion régulière d'argile. Des analyses protéomiques réalisées sur les échantillons de muqueuse des rats complétementés en kaolinite pendant 28 jours montrent également une modification de la quantité de protéines présentes impliquées dans l'organisation du cytosquelette, notamment la diminution de tubuline et de cytokératine et l'augmentation de l'actine (Reichardt et al., sous presse). Cette augmentation des monomères d'actine pourrait résulter de la dépolymérisation des filaments.

Les microvillosités des animaux complétementés, même si elles sont plus courtes, sont aussi plus larges et moins denses, et possèdent au final une surface et un volume similaire à ceux des animaux témoins. La dynamique de modification de la bordure en brosse pourrait dépendre d'une quantité plus importante d'acides gras libérés dans la lumière et absorbés, et donc de l'optimisation de la digestibilité de la ration. Cette modification de la morphologie de

la bordure en brosse pourrait être interprétée comme un moyen pour la cellule de **réduire la longueur des microvillosités et ainsi de réduire l'absorption lipidique passive chez des cellules déjà saturées, tout en maintenant une surface suffisante pour garantir des absorptions actives glucidique et protéique optimales.**

Dans le cas des animaux réalimentés avec des quantités de nourriture diminuées et restreints sans complémentation, les microvillosités adoptent des morphologies différentes, avec modification du volume. Deux réponses morphologiques sont mises en places : seule la largeur des microvillosités est augmentée dans le premier cas, alors que dans le second cas, il y a augmentation de la longueur et de la densité, associée à une diminution de la largeur. Il y aurait dans ce cas **deux mécanismes différents permettant tous deux de moduler l'absorption intestinale.** Dans le cas des animaux réalimentés avec des quantités de nourriture diminuées, la bordure en brosse adapterait une morphologie lui permettant d'accroître l'absorption active de nutriments sans augmenter celle passive des lipides. Dans le cas des animaux restreints non complémentés, la bordure en brosse modifierait sa morphologie pour accroître les absorptions actives et passives.

Ainsi, lors de la **restriction alimentaire**, l'organisme s'adapte pour absorber plus et accroître sa capacité à digérer une ration alimentaire amoindrie, avec une diminution de taille des villosités (induisant un tassement des cellules), et un allongement des microvillosités. La muqueuse des animaux restreints sans complémentation présente ainsi un profil similaire à celui des rats ayant jeûné jusqu'en phase II (Waheed et Gupta, 1997 ; Dunel-Erb et al., 2001), et permettrait de diminuer la dépense énergétique nécessaire pour maintenir optimales les structures absorptives. L'augmentation de taille des microvillosités en présence d'une ration amoindrie a déjà été observée chez des rats souffrant de cirrhoses (pathologies qui induisent des diminutions des apports alimentaires, Castilla-Cortázar et al., 1999) ainsi que chez d'autres espèces, par exemple le python (Lignot et al., 2005 ; Lignot et al., 2008). La complémentation en kaolinite durant une restriction entraîne le raccourcissement des microvillosités de 17,83 % par rapport aux animaux restreints témoins. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'à partir d'une même quantité de nourriture, les rats restreints et complémentés absorberaient plus de lipides, ce qui expliquerait la diminution de taille des microvillosités. Il n'y a cependant aucune différence de masse entre les rats restreints, complémentés ou non, à la fin des deux semaines d'expérience, ainsi que dans les pourcentages en eau des animaux (respectivement $61,42 \pm 1,59$ et $62,46 \pm 0,76$ %), représentatifs du degré d'adiposité d'un

animal (Cox et al., 1985 ; Speakman et al., 2008). Ces données préliminaires suggèrent qu'il n'y a pas de différence de masse lipidique entre les animaux restreints avec ou sans complémentation. Des analyses de composition corporelle sur ces animaux nous permettront de répondre à ces interrogations.

Pour conclure sur l'adaptation de la bordure en brosse, il faut considérer les effets de l'ingestion de kaolinite sur la muqueuse intestinale lors de l'entrée dans la phase III du jeûne. Dans notre expérience, la longueur des microvillosités des rats témoins en phase III du jeûne n'est pas significativement différente de celles des rats normalement nourris. Habituellement durant la phase II du jeûne, les microvillosités augmentent de taille (Dunel-Erb et al., 2001 ; Habold et al., 2007). Nous pouvons émettre l'hypothèse que **les microvillosités reprennent en phase III la taille qu'elles avaient avant le jeûne**. En revanche, les animaux complémentés avant ou pendant le jeûne ont des microvillosités de longueur similaires, mais plus courtes que celles des animaux témoins en début de phase III, lié probablement à la période d'adaptation de 7 jours. **L'ingestion de kaolinite pendant le jeûne, en absence de nourriture, ne modifie pas la morphologie de la bordure en brosse.**

En résumé :

- **L'ingestion de kaolinite s'accompagne d'une augmentation de l'absorption lipidique par les entérocytes.**
- **Cette absorption accrue va induire le raccourcissement des microvillosités afin de réduire l'entrée des lipides.**
- **Ce phénomène est amplifié lors de la réalimentation, lorsque les prises alimentaires sont plus importantes et de nombreux entérocytes sont saturés en gouttelettes lipidiques.**
- **Par contre, les expériences de complémentation lors du jeûne suggèrent que l'ingestion de kaolinite seule n'aurait aucun effet sur la morphologie de la bordure en brosse.**

D. Autres effets cellulaires observés après ingestion de kaolinite

Lors des différentes expériences, nous avons pu observer que l'ingestion volontaire de 5 % d'argile est accompagnée par des modifications cellulaires de deux types : la présence très importante de lipides dans les entérocytes des rats réalimentés, et une inflammation potentielle de la muqueuse intestinale après ingestion de kaolinite.

1) Présence de lipides dans les organites cellulaires

Lorsqu'ils sont saturés, les entérocytes du sommet des villosités des rats réalimentés et complémentés en kaolinite stockent les lipides dans des organites cellulaires. La formation de vésicules de stockage et/ou de purification cellulaire à partir des saccules de l'appareil de Golgi semble alors augmentée. Des phénomènes d'enroulements du RER ou de l'appareil de Golgi autour de gouttelettes lipidiques peuvent être observés, ainsi que, dans le même temps, une prolifération de lysosomes primaires. De nombreuses gouttelettes lipidiques pénètrent dans les différents organites cellulaires comme les mitochondries en perturbant fortement la membrane. Dans les cas extrêmes, des lipides peuvent même être observés à l'intérieur du noyau. La formation de vacuoles autophagiques par fusion des lysosomes primaires avec les organites saturés en lipide est aussi constatée. Elle aboutit à la formation de corps résiduels persistant dans le cytoplasme dont le contenu peut être libéré dans l'espace extracellulaire, ce qui expliquerait la présence de nombreux résidus membranaires observés dans les espaces intercellulaires.

Deux mécanismes pourraient expliquer les phénomènes observés : le stockage des lipides en excès dans les organites ou la stimulation de l'autophagie

a) Stockage des lipides en excès de la cellule

Lorsqu'ils sont saturés, les entérocytes du sommet des villosités des rats réalimentés et complémentés en kaolinite stockent les lipides dans des organites cellulaires afin de permettre **l'épuration de la cellule** (Mukherjee et Maxfield, 2004). Ils présentent des profils similaires à ceux observés chez l'Homme en cas de pathologies, comme dans la maladie de rétention des

chylomicrons. Cette pathologie fait partie du groupe des anomalies d'absorption des lipides liées aux défauts de biosynthèse et de sécrétion d'apolipoprotéine B, et est caractérisée par la présence d'entérocytes remplis de gouttes lipidiques (Boldrini et al., 2001). Elle entraîne au niveau des entérocytes la formation de nombreuses vésicules dans le cytoplasme, d'un aspect similaire à celles observées lors du présent travail. Les entérocytes de rat atteints d'une autre pathologie, la maladie de Niemann-Pick type C, présentent également ces profils extrêmes ; c'est une maladie d'origine lysosomiale caractérisée par une accumulation de cholestérol non estérifié dans les lysosomes (Mukherjee et al., 1997 ; Mukherjee et Maxfield, 2004). Dans cette première hypothèse, **les organites cellulaires et plus particulièrement les lysosomes stockeraient les lipides en excès et assureraient ainsi la survie cellulaire.**

b) Autophagie cellulaire due à une absorption massive de lipides

La prolifération des lysosomes, les enroulements membranaires, la présence de vacuoles autophagiques et de corps résiduels sont caractéristiques de la macroautophagie qui, avec la microautophagie et l'autophagie médiées par des protéines chaperones, fait partie des voies de dégradation lysosomale des constituants cellulaires connue sous le nom d'**autophagie**. Mais seule la macroautophagie (appelée autophagie dans la suite du texte) est capable de dégrader massivement des macromolécules et des organites (Cuervo, 2004).

La première étape est la formation d'une structure multimembranaire, appelé phagophore, qui s'allonge pour séquestrer du matériel cytoplasmique, formant ainsi une vacuole d'autophagie ou autophagosome (Kurz et al., 2007). Cette vacuole fusionne ensuite avec un lysosome et son contenu est alors dégradé par les enzymes lysosomales à pH acide (Rodriguez-Enriquez et al., 2004 ; Kurz et al., 2007), ce qui permet la génération d'énergie et de nutriments indispensables à la survie cellulaire (Meley et al., 2006). Les produits non digérés aboutissent à la formation de corps résiduels intracellulaires ou sont libérés dans les espaces extracellulaires (Edinger et Thompson, 2004) (Figure 83).

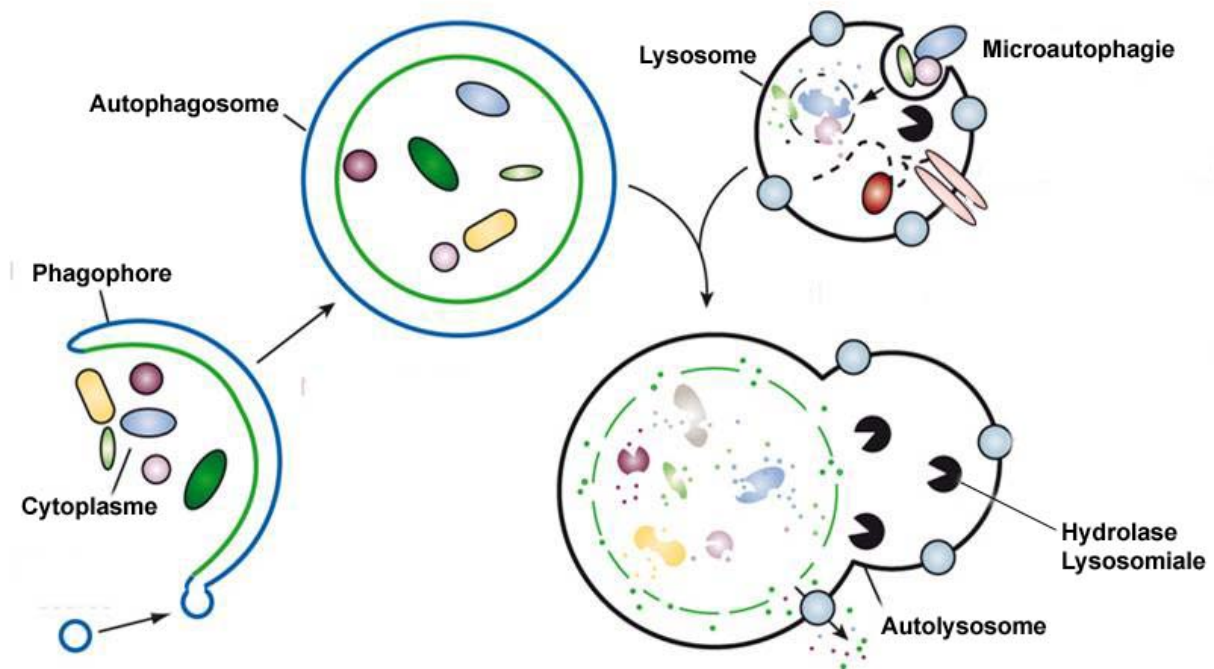


Figure 83. Schéma explicatif de la macroautophagie.
(D'après Klionsky et al., 2008)

L'autophagie est un phénomène cellulaire naturel complexe qui joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Vicencio et al., 2008). Elle est impliquée notamment dans le recyclage des mitochondries déficientes de la cellule. Ce mécanisme peut être déclenché dans la cellule par des variations dans les conditions environnementales (carence en nutriments, absence de facteurs de croissance, hypoxie et traitements anticancéreux) conduisant à un stress métabolique. Dans ces conditions, elle a une fonction adaptative puisqu'elle fournit les précurseurs requis pour permettre un renouvellement des constituants cellulaires et l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire aux besoins métaboliques (Lorin et al., 2008). Mais, de façon paradoxale, elle pourrait aussi être un mécanisme de **mort cellulaire**. La mort autophagique est caractérisée par une accumulation massive de vacuoles autophagiques et pourrait être la conséquence d'une destruction massive des constituants cellulaires due à un processus d'autophagie exacerbé (Meley et al., 2006). Dans beaucoup de situations, l'autophagie observée dans les cellules mourantes serait en fait un effort désespéré de la cellule pour survivre à une situation de stress. Le fait que l'autophagie puisse être un type de mort cellulaire chez les Mammifères *in vivo* reste encore à démontrer (Codogno et Meijer, 2005 ; Scarlatti et al., 2008).

Deux autres types de mort cellulaire ont été identifiés dans nos échantillons, l'apoptose et la nécrose (Scarlatti et al., 2008). L'**apoptose** ou mort cellulaire programmée est caractérisée

par l'activation d'une famille de protéases, les caspases, la condensation de la chromatine et sa fragmentation, le rétrécissement cellulaire, la convulsion de la membrane plasmique et la formation de corps apoptotiques relargués et phagocytés par les cellules voisines sans déclencher de réaction inflammatoire (Edinger et Thompson, 2004 ; Krysko et al., 2007). En absence de régulation, la mort cellulaire ou **nécrose** se manifeste par le gonflement généralisé des organites cellulaires, l'éclaircissement du cytoplasme, la dégénérescence du cytosquelette, la rupture des membranes et la fragmentation des microvillosités (Martins et al., 2001, Edinger and Thompson, 2004 ; Krysko et al., 2007). Elle est causée par des enzymes produites par les lysosomes. Le déversement du contenu cellulaire dans le tissu environnant provoque une **réponse inflammatoire** (Galluzzi et al., 2007). L'absorption massive de lipides par les entérocytes pourrait les conduire à la mort cellulaire. Un lien étroit semble exister entre nécrose et autophagie, la mort par nécrose n'interviendrait que lorsque l'autophagie a échoué à maintenir l'intégrité cellulaire (Meier et Vossen, 2007).

Malgré des différences marquées, ces trois formes de mort cellulaire impliquent des mécanismes communs tels que **l'activation des lysosomes** ou **l'induction transitoire de la perméabilité de la membrane mitochondriale**, mais à des degrés différents (Lemasters et al., 1998). Lorsque quelques mitochondries deviennent perméables, l'activation de l'autophagie conduit à la destruction lysosomale des mitochondries affectées et à la réparation de la cellule. Lorsque ce mécanisme de défense cellulaire échoue et qu'un plus grand nombre de mitochondries est impliqué, la perméabilisation mitochondriale commence à promouvoir l'apoptose (Rodriguez-Enriquez et al., 2004 ; Codogno et al., 2005). Finalement, lorsque la perméabilisation mitochondriale implique toutes les mitochondries de la cellule, la quantité d'énergie fournie est profondément réduite et une nécrose s'ensuit rapidement (Lemasters et al., 1998). Cette manière graduelle de fonctionner permet au tissu d'abord de promouvoir la réparation cellulaire, puis d'éliminer des cellules endommagées (Rodriguez-Enriquez et al., 2004). Dans nos observations, **les trois phénomènes semblent se superposer**, une étude plus approfondie serait nécessaire pour mieux comprendre les passages de l'un à l'autre.

Cette augmentation de la perméabilité mitochondriale est également observée **en cas de stress ou de pathologie** (Stoev et al., 1998). Des analyses protéomiques réalisées dans le cas d'une complémentation en kaolinite sur 28 jours ont mis en évidence des changements d'expressions de protéines de stress, les facteurs HSP 60 et HSP 70, entre les rats témoins et les rats complémentés ainsi que des variations d'expression de protéines du cytosquelette

intestinal, sans toutefois présenter des signes d'apoptose (Reichardt et al., sous presse). Ainsi, l'absorption lipidique saturante, liée à la présence de particules d'argile dans la lumière intestinale, pourrait conduire à une situation de **stress cellulaire**. Des signes d'autophagie sont également visibles chez les animaux à jeun, avec ou sans argile. Il est connu que la privation de nutriments est l'inducteur d'autophagie le plus décrit en culture cellulaire (Vicencio et al., 2008). En effet, en dégradant les macromolécules, l'autophagie permet de générer de l'ATP et de survivre (Vicencio et al., 2008). Cette fonction de l'autophagie peut aussi participer à la prolongation de la vie d'un organisme en restriction calorique. La **restriction** ou le **jeûne** sont deux des plus forts stimuli de l'autophagie dans tous les organismes (Vicencio et al., 2008).

2) Inflammation de la muqueuse

En s'intéressant aux chorions des villosités des rats complémentés en kaolinite, nous avons pu observer la présence de cellules impliquées dans les réactions inflammatoires, notamment des granulocytes polynucléaires éosinophiles, des plasmocytes et des mastocytes. Résidant habituellement dans les tissus, ces derniers recrutent en cas d'inflammation les granulocytes éosinophiles, qui une fois activés libèrent leurs grains de sécrétions dans l'épithélium contribuant ainsi à maintenir l'intensité de la réponse (Das et al., 1998 ; Yang et al., 2001). Chez les animaux complémentés en kaolinite, nous avons pu observer des granulocytes éosinophiles et des mastocytes en état de dégranulation, synonyme d'activation.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces phénomènes inflammatoires : la présence d'aluminium et/ou des phénomènes de nécrose observés après ingestion de kaolinite.

a) Réaction inflammatoire liée à la présence d'aluminium

Nous avons vu que l'ingestion de kaolinite est associée à la libération et à l'absorption d'aluminium. L'absorption de cet élément et sa présence dans les cellules et/ou dans le sang **peut entraîner des réactions inflammatoires** (Yang et al., 2001 ; Lukiw et al., 2005 ; Deicher et Hörl, 2004).

(1) L'aluminium, une fois dans les cellules, est stocké dans le cytosol des cellules (Van der Voet et al., 1992), puis entre dans les lysosomes sous la forme d'hydroxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Bragadin et al., 2004), activant les enzymes lysosomiales et la formation de phagosomes et entraînant **une inflammation des tissus** et des **phénomènes de nécrose** (Yang et al., 2001). Des doses nanomolaires en aluminium induisent l'expression de gènes pro-inflammatoires et pro-apoptotiques dans les cellules du cerveau chez l'homme (Fu et al., 2003 ; Jonhson et al., 2004 ; Lukiw et al., 2005).

(2) L'aluminium dans le sang entraîne une **anémie** en se fixant sur la transferrine (Powell et al., 1994; Vittori et al., 1999 ; Winklhofer et al., 2000). Ceci entraîne des altérations des érythrocytes (Vittori et al., 1999 ; Farina et al., 2005). Appauvries en fer, les hémoglobines vont alors fixer moins d'oxygène, et ce manque d'oxygénation du sang va entraîner l'inflammation de l'épithélium intestinal (Nicolas et al., 2002 ; Deicher et Hörl, 2004). Les inflammations de la muqueuse intestinale, notamment duodénale, causées par la saturation de la transferrine, conduisent à l'activation des monocytes (Deicher et Hörl, 2004).

Les animaux complémentés en **montmorillonite** présentent peu de cellules impliquées dans l'inflammation au sein de la muqueuse intestinale. Cette absence de signes d'inflammation pourrait s'expliquer également par la très faible quantité d'aluminium absorbée lors de la complémentation en montmorillonite comme décrit précédemment.

b) Réaction inflammatoire liée à la nécrose

Après ingestion de kaolinite, nous avons observé des cellules en nécrose ainsi qu'une augmentation de l'autophagie dans les cellules saturées en lipides ou dans les entérocytes des animaux ayant jeûné. Or un lien étroit semble exister entre nécrose et autophagie. Lorsque l'autophagie a échoué à maintenir l'intégrité cellulaire, la mort interviendrait par nécrose (Meier et al., 2007), ce qui aboutit, comme nous l'avons vu, au déversement du contenu cellulaire dans le tissu environnant ce qui provoque une **réponse inflammatoire** (Galluzzi et al., 2007).

Un autre point important est l'observation d'une présence plus importante de granulocytes éosinophiles et de mastocytes, également observée chez les animaux restreints, avec ou sans

complémentation. Lors de cette expérience, les animaux témoins non restreints présentaient des profils similaires à ceux des témoins des autres expériences, ce qui semble écarter la possibilité d'une contamination amenée par la nourriture et/ou l'eau de boisson. La présence amplifiée de cellules inflammatoires activées chez ces animaux restreints sans complémentation pourrait être le reflet d'une augmentation des phénomènes de nécrose.

Il semble fondamental dans un proche avenir de valider l'hypothèse que l'ingestion de kaolinite entraînerait une réaction inflammatoire et de les quantifier (observations et colorations des cellules impliquées, mesures des concentrations des substances libérées au moment d'activations des leucocytes – histamine, sérotonine, grains de sécrétions – ou encore des cytokines impliquées dans ces phénomènes).

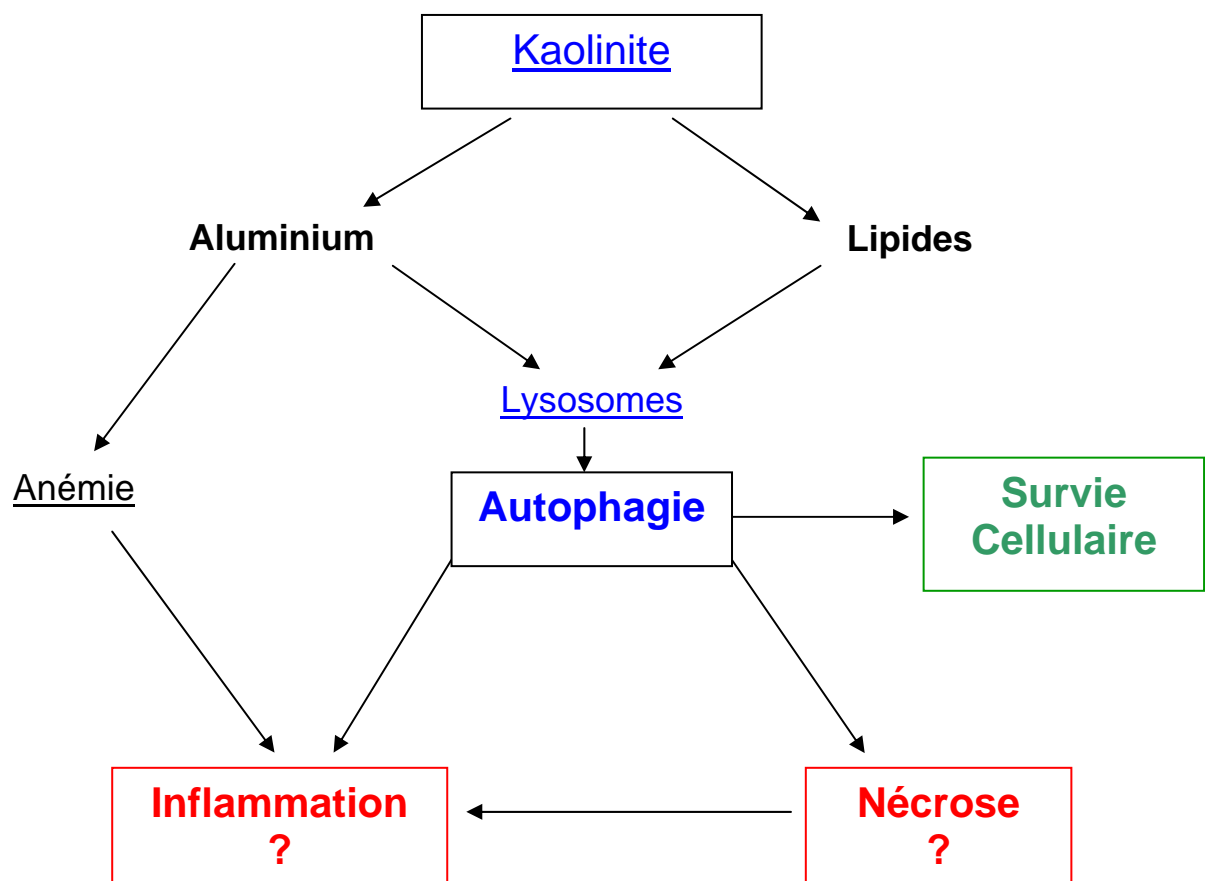


Figure 84. Schéma récapitulatif des phénomènes d'autophagie et d'inflammation mis en place lors de l'ingestion de kaolinite.

c) Argiles et réaction anti-inflammatoire

Dans nos études, les chorions des rats complémentés en montmorillonite présentent peu de signes d'inflammation. Cela n'est peut-être pas surprenant dans la mesure où des études antérieures ont montré que la présence de smectite dans le mucus entraîne une résistance gastro-intestinale aux agressions variées (Moré et al., 1987 ; Gwozdziński et al., 1997 ; Xia et al., 2004 ; Chang et al., 2007) et permet de lutter contre les inflammations intestinales (Theodorou et al., 1994 ; Droy-Lefaix and Tateo, 2006). L'ingestion de smectite est connue pour diminuer l'expression de TNF- α (facteur nécrosant des tumeurs), importante cytokine impliquée dans l'inflammation systémique (Mahraoui et al., 1997).

De plus, les smectites pourraient favoriser la diminution des réactions inflammatoires dans la lumière intestinale, en facilitant la **cicatrisation tissulaire** au niveau de la paroi de l'épithélium. Les argiles possèdent les capacités d'accroître la mise en place des mécanismes nécessaires aux cicatrisations des tissus (Mascolo et al., 1999). Une déchirure de la paroi causée par une nécrose cellulaire sera rapidement recouverte par un mucus abondant (Arnold et al., 1993), et ceci permettra la fixation préférentielle des particules d'argile. Dans le cas des smectites – qui possèdent un grand pouvoir de recouvrement et une réactivité élevée, leur présence sur la paroi, au contact de plaies, permettrait une interaction privilégiée avec les glycoprotéines du mucus et donc une meilleure adhésion du mucus à la plaie, ce qui pourrait expliquer en partie le pouvoir anti-inflammatoire des smectites (González et al., 2004).

En résumé :

- **L'ingestion de kaolinite lors d'hyperphagie est accompagnée d'une saturation lipidique dans les entérocytes.**
- **Des mécanismes d'autophagie sont mis en place afin de permettre la survie de la cellule, et en cas d'échec, entraîner sa mort.**
- **Parallèlement, la consommation de kaolinite pourrait s'accompagner d'inflammation de l'épithélium intestinal, liée à la présence d'aluminium provenant de la kaolinite et/ou à l'augmentation des phénomènes de nécrose. L'ingestion de montmorillonite ne semble pas entraîner de réaction inflammatoire.**

CONCLUSION – PERSPECTIVES

CONCLUSION

Cette étude menée en laboratoire apporte des connaissances nouvelles sur la complémentation volontaire en argile et sur les mécanismes d'interaction pouvant intervenir à l'interface avec la muqueuse jéjunale.

Un des résultats majeurs de ces travaux où on laisse les animaux fixer par eux-mêmes leurs niveaux de complémentation, est que les **pourcentages de complémentation sont similaires** d'un régime alimentaire à un autre et reflèteraient un rapport optimal avec les quantités de nourriture ingérée. L'ingestion de 5% d'argile dans la ration alimentaire tend à entraîner une diminution de la prise alimentaire chez les animaux ayant des consommations de nourriture élevée, sans modifier le gain de masse corporelle (Figure 85). L'optimisation de la digestibilité de la ration permettrait alors de **réduire l'énergie dépensée** pour un même rendement d'absorption. Il était connu que la présence de particules d'argile augmente la digestibilité de la ration alimentaire dans la lumière intestinale, mais l'étude entreprise ici montre que **l'intestin réagit à l'augmentation de la concentration des acides gras consécutive à l'ingestion de kaolinite ou de montmorillonite en modifiant la morphologie de son épithélium** (Figure 85). Les adaptations observées sont principalement une diminution de la longueur des microvillosités, qui en retour permettrait de réduire l'absorption de lipides et probablement l'énergie nécessaire pour maintenir une telle plasticité. Ainsi, la complémentation avec des argiles permettrait aux animaux ayant subi un jeûne prolongé de reconstituer leurs réserves à partir de rations alimentaires amoindries, ce qui représenterait alors une **économie d'énergie** essentielle lors des phases de réalimentation où un maximum d'énergie est requis (Figure 85). Ces nouvelles données pourraient apporter un début d'explication à la géophagie, comportement complexe observé dans le milieu naturel et pouvant avoir plusieurs motivations.

Cette étude révèle également qu'une fraction des particules argileuses ingérées peut être **partiellement dissoute, libérant divers composants (Al, Si) dans le chyme ou directement**

dans le mucus qui recouvre les muqueuses intestinales, sous l'effet probable des sécrétions acides de l'estomac et de la dégradation progressive des aliments. L'absorption de l'aluminium, au travers de la muqueuse intestinale pourrait avoir des conséquences graves liées à l'ingestion de cette argile, en raison notamment de son pouvoir toxique élevé. C'est une nouvelle vue d'un danger potentiel lié à l'ingestion importante de kaolinite (Figure 85).

Ce dernier point tout-à-fait crucial pour l'organisme pourrait représenter une limite des effets apportés par l'ingestion d'argile. Le pouvoir potentiellement toxique de l'aluminium serait ainsi en balance avec l'efficacité alimentaire accrue et le seuil de 5 % de complémentation auto-fixé par les rats pourrait définir un point d'équilibre entre différents effets physiologiques, bénéfiques aux animaux en cas d'optimisation de la digestibilité alimentaire ou potentiellement négatifs si cela conduit à une dénaturation de certains tissus.

Quoi qu'il en soit, les effets révélés dans ces expériences montrent une réelle interaction des argiles avec la muqueuse intestinale, nécessitant d'être étudiée plus en détail dans le futur, en affinant les investigations (caractérisation des minéraux, suivi des interactions argile-aliments dans l'estomac, suivi des interactions argile-aliments-muqueuse intestinale, analyses au niveau de l'organisme entier, etc...). Les travaux menés au cours de ces trois années de doctorat, ont permis l'acquisition de données complémentaires, au sein de notre équipe ainsi qu'en collaboration élargie au sein de l'IPHC, dans le cadre de l'ANR Proteonutr 2005-2008. Ils soulignent l'importance de ces travaux préliminaires et la nécessité de développer les approches pluridisciplinaires menées à la frontière des sciences géochimiques et biologiques.

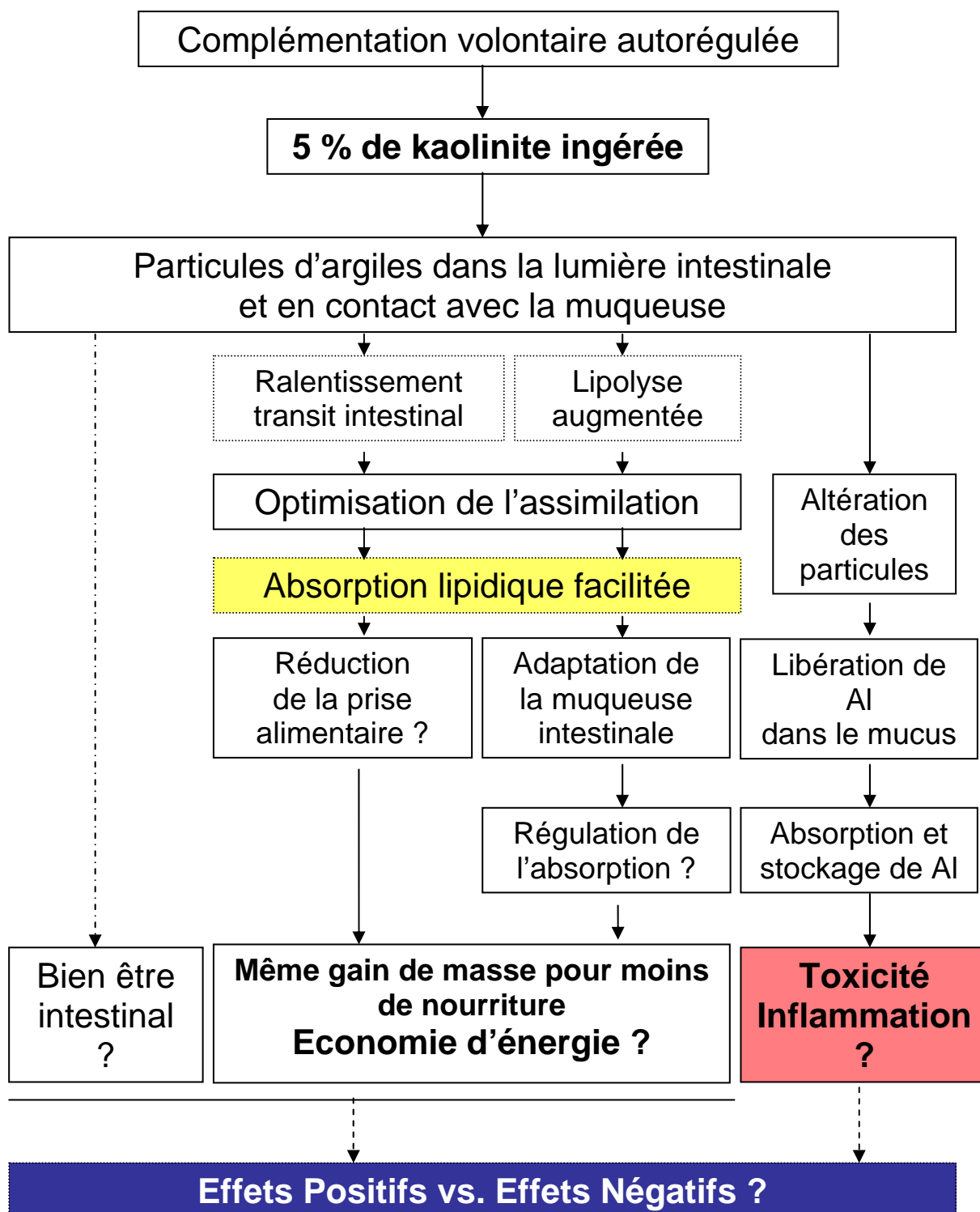


Figure 85. Schéma récapitulatif des résultats obtenus et des hypothèses émises dans cette étude. Les animaux complémenteés consomment volontairement 5 % de kaolinite dans leurs rations alimentaires quotidiennes, ce qui induit un effet bénéfique sur l'intestin. La présence d'argile va augmenter la digestibilité de la ration ce qui va entraîner une augmentation de l'absorption lipidique passive. La muqueuse intestinale va s'adapter afin de réguler l'absorption et pourrait diminuer la prise alimentaire. Une partie des particules de kaolinite sont altérées au cours de leur passage dans le tube digestif ce qui va entraîner la libération de l'aluminium, élément toxique pour les cellules.

PERSPECTIVES

Les travaux entrepris ici ont permis d'apporter des données originales sur l'interaction des argiles avec la muqueuse intestinale lors d'une complémentation spontanée en argile (kaolinite surtout, et montmorillonite accessoirement).

Les premiers résultats acquis appellent à poursuivre les travaux avec différentes adaptations et orientations.

- **Différencier les protocoles de complémentation.**
- **Affiner l'approche minéralogique et physicochimique à l'interface argile/mucus/aliment/enzyme (comparaison in vivo/in vitro).**
- **Affiner l'approche physiologique et cellulaire de la modification de la muqueuse gastro-intestinale.**
- **Evaluer l'impact de l'argile sur la modulation nerveuse et neurohumorale de la motricité digestive (comparaison in vivo/in vitro).**

Au terme de ce travail de recherche initié il y a trois ans, il me paraît opportun de souligner l'importance de cette approche nouvelle et pluridisciplinaire portant sur l'étude des effets des argiles et des nanomatériaux poreux dans le monde vivant. Cette dynamique perceptible depuis peu ouvre en effet de grandes perspectives en biologie grâce aux apports des techniques récentes de chimie et de physique appliquées aux nanomatériaux. En répondant aux différents points cités plus haut et fort d'un soutien d'une petite communauté scientifique grandissante, il me paraît crucial de poursuivre les travaux de recherche en physiologie intégrée sur cet axe complexe mais enrichissant, à l'interface entre « le monde des argiles » (naturelles, de synthèse et enrichies), le tractus digestif et l'organisme entier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Wahhab, M.A., Hasan, A.M., Aly, S.E., Mahrous, K.F.** (2005). Adsorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Mutation Research*. **582**: 20-27.
- Abrahams, P.W.** (1997). Geophagy (soil consumption) and iron supplementation in Uganda. *Trop. Med. Int. Health*. **2**: 617-623.
- Albengres, E., Urien, S., Tillement, J.P., Oury, P., Decourt, S., Flouvat, B., Drieu, K.** (1985). Interactions between smectite, a mucus stabilizer, and acidic and basic drugs. In vitro and in vivo studies. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **28**: 601-605.
- Allen, P.A.** (1997). Earth surface processes, Blackwell. 404 pp
- Altmann, G.G, Leblond, C.P.** (1970). Factors influencing villus size in the small intestine of adult rats as revealed by transposition of intestinal segments. *Am. J. Anat.* **127**: 15-36.
- Altmann, G.G.** (1972). Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am. J. Anat.* **133**: 391-400.
- Andrew, W., Sosa, J.M.** (1947). Mitotic division and degeneration of lymphocytes within cells of intestinal epithelium in young and in adult white mice. *Anat. Rec.* **97**: 63-97.
- Andrews, P.L.R., Horn, C.C.** (2006). Signals for nausea and emesis: Implications for models of upper gastrointestinal diseases. *Auton. Neurosci.* **125**: 100-115.
- Arnold, J.W., Klimpel, G.R. and Niesel, D.W.** (1993). Tumor necrosis factor (TNF alpha) regulates intestinal mucus production during salmonellosis. *Cell. Immunol.* **151**: 336-344.
- Aufreiter, S., Hancock, R.G.V., Mahaney, W.C., Stambolic-Robb, A., Sanmugadas, K.** (1997). Geochemistry and mineralogy of soils eaten by humans. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **8**: 293-305.
- Aufreiter, S., Mahaney, W.C., Milner, M.W., Huffman, M.A., Hancock, R.G., Wink, M., Reich, M.** (2001). Mineralogical and chemical interactions of soils eaten by chimpanzees of the Mahale mountains and Gombe Stream National Parks, Tanzania. *J. Chem. Ecol.* **27**: 285-311.
- Bailey, S.W.** (1980). Summary of recommendations of AIPEA nomenclature committee on clay minerals, *American Mineralogist*. **65**: 1-7

- Ballance, S., Sheehan, J.K., Tkachenko, A., McCrohan, C.R., White, K.N.** (2002). Interactions of mucus with freshly neutralised aluminium in freshwater. *J. Inorg. Biochem.* **92**: 11-18.
- Belkhou, R., Cherel, Y., Heitz, A., Robin, J.P., Le Maho, Y.** (1991). Energy contributions of proteins and lipids during prolonged fasting in the rat. *Nutr. Res.* **11**: 365-374.
- Bergaya, F., Theng, B.K.G., Lagaly, G.** (2006). Handbook of clay science. Developments in Clay Science, 1. Elsevier, 1224 pp.
- Berthoud, H.R.** (2008). Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction. *Neurogastroenterol. Motil.* **20**: 64-72.
- Boldrini, R., Biselli, R., Bosman, C.** (2001). Chylomicron retention disease. The role of ultrastructural examination in differential diagnosis. *Pathol. Res. Pract.* **197**: 753-757.
- Bondy, S.C., Harrington, M.E.** (1979). L-amino acids and D-glucose bind stereospecifically to a colloidal clay. *Science.* **23**: 1243-1244.
- Bragadin, M., Manente, S., Scutari, G., Rigobello, M.P., Bindoli, A.** (2004). A possible transport mechanism for aluminum in biological membranes. *J. Inorg. Biochem.* **98**: 1169-1173.
- Brightsmith, D.J., Muñoz-Najar, A.R.** (2004). Avian geophagy and soil characteristics in Southeastern Peru. *Biotropica.* **36**: 534-543.
- Brindley, G.W., Brown, G.** (1984). Crystal structures of clay minerals and their X-ray identification. Mineralogical Society of London, Monography 5, 495 pp.
- Buts, J.P., Vijverman, V., Barudi, C., De Keyser, N., Maldague, P., Dive, C.** (1990). Refeeding after starvation in the rat: comparative effects of lipids, proteins and carbohydrates on jejunal and ileal mucosal adaptations. *Eur. J. Clin. Invest.* **20**: 441-452.
- Cabezos, P.A., Vera, G., Castillo, M., Fernández-Pujol, R., Martín, M.I., Abalo, R.** (2008). Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica. *Auton. Neurosci.* **141**: 54-65.
- Cabrera, F., Talibudeen, O.** (1978). The release of aluminium from aluminosilicate minerals. I. Kinetics. *Clay. Clay Miner.* **26**: 434-440.
- Cabrera, F., Talibudeen, O.** (1979). The release of aluminum from aluminosilicate minerals; II, Acid-base potentiometric titrations." *Clay. Clay Miner.* **27**: 113-118.
- Caillère, S., Henin, S., Rautureau, M.** (1982). Minéralogie des argiles. 2nd ed, Masson. 2 tomes, 384 pp.

- Cairnie, A.B., Lamerton, L.F., Steel, G.G.** (1965). Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. *Exp. Cell. Res.* **39**: 528–538.
- Capasso, R., Izzo, A.A.** (2008). Gastrointestinal regulation of food intake: general aspects and focus on anandamide and oleoylethanolamide. *J. Neuroendocrinol.* **20**: 39-46.
- Carré, B.** (2000). Effets de la taille des particules alimentaires sur les processus digestifs chez les oiseaux d'élevage. *INRA Prod. Anim.* **13**: 131-136.
- Cartwright, I.J., Higgins, J.A.** (1999). Isolated rabbit enterocytes as a model cell system for investigations of chylomicron assembly and secretion. *J. Lipid Res.* **40**: 1357-1365.
- Castaing, J., Noblet, J.** (1997). Effect of addition of sepiolite on digestive utilization of feed and performance in growing pigs. *Journées Rech. Porcine en France.* **29**: 213-220.
- Castilla-Cortázar, I., Picardi, A., Tosar, A., Ainzúa, J., Urdaneta, E., Garcíá, M., Pascual, M., Quiroga, J., Prieto, J.** (1999). Effect of insulin-like growth factor I on in vivo intestinal absorption of D-galactose in cirrhotic rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **276**: 37-42.
- Cau, P., Seïte, R.** (1997). Cours de biologie cellulaire. Ellipses, Paris. 480 pp.
- Chandrajith, R., Kudavidanage, E., Tobschall, H., J., Dissanayake, C.B.** (2008). Geochemical and mineralogical characteristics of elephant geophagic soils in Udawalawe National Park, Sri Lanka. *Environ. Geochem. Health.* doi:10.1007/s10653-008-9178-5.
- Chang, F.Y., Lu, C.L., Chen, C.Y., Luo, J.C.** (2007). Efficacy of dioctahedral smectite in treating patients of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**: 2266-2272.
- Chaumande, B.** Thèse en cours.
- Cherel, Y., Le Maho, Y.** (1991). Refeeding after the late increase in nitrogen excretion during prolonged fasting in the rat. *Physiol. Behav.* **50**: 345-349.
- Cherel, Y., Robin, J.P., Heitz, A., Calgari, C., Le Maho, Y.** (1992). Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J. Comp. Physiol. B.* **162**: 305-313.
- Clauer, N., Chaudhuri, S.** (1995). Clays in Crustal Environments: Isotope Dating and Tracing. Springer Verlag, Berlin. 359 pp.
- Cochran, M., Goddard, G., Ramm, G., Ludwigson, N., Mrshall, J., Halliday, J.** (1993). Absorbed aluminium is found with two cytosolic protein fractions, other than ferritin, in the rats duodenum. *Gut.* **34**: 643-646.

- Codogno, P., Meijer, A.J.** (2005). Autophagy and signalling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* **12**: 1509-1518.
- Coffey, K.P., Nagaraja, T.G., Towne, E.G., Brazle, F.K, Moyer, J.L.** (2000). Digestibility of prairie hay diets supplemented with different levels of magnesium-mica by beef heifers. *J. Anim. Sci.* **78**: 718-725.
- Coudrier, E., Arpin, M., Dubouet, B., Finidori, J., Garcia, A., Huet, C., Pringault, E., Robine, S., Sahuquilo-Merino, C., Louvard, D.** (1988). Villin as a structural marker to study the assembly of the brushborder. *Protoplasma.* **145**: 99-105.
- Cox, J.E., Laughton, W.B., Powley, T.L.** (1985). Precise estimation of carcass fat from total body water in rats and mice. *Physiol. Behav.* **35**: 905-910.
- Cross, P.C., Mercer, K.L.** (1993). Cell and tissue ultrastructure: A functional perspective. United States of America : W. H. Freeman and Co. De Boeck et Larcier pour la traduction française. De Boeck Université. 420 pp.
- Cuervo, A.M.** (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* **14**: 70-77.
- Cunat, L., Lanhers, M.C., Joyeux, M., Burnel, D.** (2000). Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats: effects of aluminum compounds and some dietary constituents. *Biol Trace Elem Res.* **76**: 31-55.
- Danford, D.E.** (1982). Pica and nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **2**: 303-322.
- Das, A.M., Flower, R.J., Peretti, M.** (1998). Resident mast cells are important for eotaxin-induced eosinophil accumulation in vivo. *J. Leukocyte. Biol.* **64**: 156-162.
- Daugherty, A.L., Randall, J.M.** (1999). Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier. Part one. *Pharm. Sci. Technolo. Today.* **4**: 144-151.
- Deicher, R., Hörl, W.H.** (2004). Heparin: a molecular link between inflammation and anaemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**: 521-524.
- De Jonghe, B.C., Horn, C.C.** (2008). Chemotherapy-induced pica and anorexia are reduced by common hepatic branch vagotomy in the rat. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**: 756-765.
- De Souza, L.L., Ferrari, S.F., Da Costa, M.L., Kern., D.C.** (2002). Geophagy as a Correlate of folivory in red-handed howler monkeys (*Alouatta belzebul*) from eastern brazilian Amazonia. *J. Chem. Ecol.* **28**: 1613-1621.
- Diamond, J.** (1999). Dirty eating for healthy living. *Nature.* **400**, 120-121.
- Diamond, J., Bishop, K.D., Gilardi, J.D.** (1999). Geophagy in New Guinea bird. *Ibis.* **141**: 181-193.

- Dominy, N.J., Davoust, E., Minekus, M.** (2004). Adaptive function of soil consumption: An in vitro study modeling the human stomach and small intestine. *J. Exp. Biol.* **207**: 319-324.
- Dou, Y., Gregersen, S., Zhao, J., Zhuang, F., Gregersen, H.** (2001). Effect of re-feeding after starvation on biomechanical properties in rat small intestine. *Med. Eng. Phys.* **23**: 557-566.
- Droy-Lefaix, M.T., Drouet, Y., Schatz, B.** (1985). Sodium glycodeoxycholate and spinability of gastrointestinal mucus - Protective effect of smectite. *Gastroenterology.* **88**: 1369-1369.
- Droy-Lefaix, M.T., Tateo, F.** (2006). Clays and clay minerals as drugs. In: Bergaya, F., Theng, B.K.G. and Lagaly, G. Eds, *Handbook of Clay Science, Developments in Clay Science*, Elsevier, Amsterdam (2006), vol 1 pp. 743–752.
- Drüeke, T.B.** (2002). Intestinal absorption of aluminium in renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17**: 13-16.
- Dunel-Erb, S., Chevalier, C., Laurent, P., Bach, A., Decrock, F., Le Maho, Y.** (2001). Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comp. Biochem. Physiol. - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* **129**: 933-947.
- Edinger, A.L., Thompson, C.B.** (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 663-669.
- Endo, T., Hamaue, N., Ihira, E., Teramoto, Y., Liu, Y., Hirafuji, M., Minami, M.** (2002). Effects of granisetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on 5-hydroxytryptamine (5-HT) release from the isolated ileum in a delayed-emesis rat model. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* **111**: 55-68.
- Fain-Maurel, M.A.** (1991). *Biologie cellulaire*. Paris: Bréal. 2^{ème} édition. 2 volumes, 364 pp.
- Farina, M., Rotta, L.N., Soares, F.A.A., Jardim, F., Jacques, R., Souza, D.O., Rocha, J.B.T.** (2005). Hematological changes in rats chronically exposed to oral aluminum. *Toxicology.* **209**: 29-37.
- Ferrari, S.F., Veiga, L.M., Urbani, B.** (2008). Geophagy in New World Monkeys (Platyrrhini): Ecological and Geographic Patterns. *Folia Primatol.* **79**: 402-415.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **49**, pp. 497–509.
- Friedman, H.I., Nylund, B.** (1980). Intestinal fat digestion, absorption, and transport. A review. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 1108-1139.

- Fu, H.J., Hu, Q.S., Lin, Z.N., Ren, T.L., Song, H., Cai, C.K., Dong, S.Z.** (2003). Aluminum-induced apoptosis in cultured cortical neurons and its effect on SAPK/JNK signal transduction pathway. *Brain Res.* **980**: 11-23.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vittale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G.** (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **14**: 1237-1266.
- Geissler, P.W., Mwaniki, D.L., Thiong'o, F., Michaelsen, K.F., Friis, H.** (1998 a). Geophagy, iron status and anaemia among primary school children in Western Kenya. *Trop. Med. Int. Health.* **3**: 529-534.
- Geissler, P.W., Shulman, C.E., Prince, R.J., Mutemi, W., Mnazi, C., Friis, H., Lowe, B.** (1998 b). Geophagy, iron status and anaemia among pregnant women on the coast of Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **92**: 549-553.
- Gilardi, J.D., Duffey, S.S., Munn, C.A., Tell, L.A.** (1999). Biochemical functions of geophagy in parrots: Detoxification of dietary toxins and cytoprotective effects. *J. Chem. Ecol.* **25**: 897-922.
- Girardeau, J.P.** (1987). Smectite aggregation by *Escherichia coli*. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* **50**: 181-192.
- Goda, T., Takase, S.** (1994) Effect of dietary-fat content on microvillus in rat jejunum. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **40**: 127-136.
- Golub, M.S., Donald, J.M., Gershwin, M.E., Keen, C.L.** (1989). Effects of aluminium ingestion on spontaneous motor activity of mice. *Neurotoxicol. Teratol.* **11**: 231-235.
- Gomes, C.S.F., Silva, J.B.P.** (2007). Minerals and clay minerals in medical geology. *Appl. Clay Sci.* **36**: 4-21.
- González, R., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., Nieto, A., Gálvez, J., Risco, S., Zarzuelo, A.** (2004). Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **141**: 951-960.
- Goodlad, R.A., Lenton, W., Ghatei, M.A., Adrian, T.E., Bloom, S.R., Wright, N.A.** (1987). Effects of an elemental diet, inert bulk and different types of dietary fiber on the response of the intestinal epithelium to refeeding in the rat and relationship to plasma gastrin, enteroglucagon, and Pyy concentrations. *Gut.* **28**: 171-180.
- Goodlad, R.A., Plumb, J.A., Wright, N.A.** (1988). Epithelial-cell proliferation and intestinal absorptive function during starvation and refeeding in the Rat. *Clin. Sci.* **74**: 301-306.

- Goodlad, R.A., Ratcliffe, B., Fordham, J.P., Wright, N.A.** (1989). Does dietary fiber stimulate intestinal epithelial-cell proliferation in germ free rats. *Gut*. **30**: 820-825.
- Goodman, M.N., Larsen, P.R., Kaplan, M.M., Aoki, T.T., Young, V.R., Ruderman, N.B.** (1980). Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am. J. Physiol.* **239**: 277-286.
- Grignon, G.** (1996). Cours d'histologie. Paris : Ellipses. 1 volume, 366 pp.
- Grim, R.E.** (1962). Applied Clay Mineralogy. McGraw-Hill, New York. 422 pp..
- Grosicki, A., Kowalski, B.** (2003). Influence of bentonite on trace element kinetics in rats. 1. Iron. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* **47**: 555-558.
- Gwozdziński, K., Jedrzejewska, A., Janocka, M., Droy-Lefaix, M.T.** (1997). Effect of diosmectite on the physico-chemical properties of gastric mucus *in vivo* and *in vitro*. *Gastroenterology*. **12**, abstract 136.
- Habold, C., Dunel-Erb, S., Chevalier, C., Laurent, P., Le Maho, Y., Lignot, J.H.** (2003). Observations of the intestinal mucosa using environmental scanning electron microscopy (ESEM); comparison with conventional scanning electron microscopy (CSEM). *Micron*. **34**: 373-379.
- Habold, C., Chevalier, C., Dunel-Erb, S., Foltzer-Jourdainne, C., Le Maho, Y., Lignot, J.H.** (2004). Effects of fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats in relation to depletion of body stores. *Scand. J. Gastroentero.* **39**: 531-539.
- Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Le Maho, Y., Lignot, J.H., Oudart, H.** (2005). Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. *J. Physiol.* **566**: 575-586.
- Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Le Maho, Y., Lignot, J.H.** (2006). Intestinal apoptotic changes linked to metabolic status in fasted and refed rats. *Pflugers Arch.* **451**: 749-759.
- Habold, C., Reichardt, F., Foltzer-Jourdainne, C., Lignot, J.H.** (2007). Morphological changes of the rat intestinal lining in relation to body stores depletion during fasting and after refeeding. *Pflugers Arch.* **455**: 323-332.
- Habold, C., Reichardt, F., Le Maho, Y., Liewig, N., Lignot, J.H., Oudart, H.** Clay ingestion enhances triglyceride hydrolysis and non-esterified fatty acids absorption. *Brit. J. Nutr. Sous presse*.
- Halsted, J.A.** (1968). Geophagia in man: its nature and nutritional effects. *Am. J. Clin. Nutr.* **21**: 1384-1393.

- Hamilton, R.L., Wong, J.S., Cham, C.M., Nielsen, L.B., Young, S.G.** (1998). Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J. Lipid. Res.* **39**: 1543-1557.
- Hanczyc, M.M., Fujikawa, S.M., Szostak, J.W.** (2003). Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth, and division. *Science.* **302**: 618-622.
- Harbers, L.H.** (1975). Starch granule structural changes and amyloitic patterns in processed sorghum grain. *J. Anim. Sci.* **41**: 1496-1501.
- Haydel, S.E., Remenih, C.M., Williams, L.B.** (2008). Broad-spectrum *in vitro* antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 353–361.
- Heidbreder, C.A., Weiss, I.C., Domeney, A.M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, J., Moran, M.C., Nelson, P.** (2000). Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience.* **100**: 749-768.
- Heymann, E., Hartmann, G.** (1991). Geophagy in Moustached Tamarins, *Saguinus mystax* (Platyrrhini: Callitrichidae), at the Rio Blanco, Peruvian Amazonia. *Primates.* **32**: 533-537.
- Hill, J.O., Latiff, A., Digirolamo, M.** (1985). Effects of variable caloric restriction on utilization of ingested energy in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **248**: 549-559.
- Hill, J.O., Thacker, S., Newby, D., Stykes, M.N., Digirolamo, M.** (1988). Influence of food restriction coupled with weight cycling on carcass energy restoration during ad-libitum refeeding. *Int. J. Obes.* **12**: 547-555.
- Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L., Spurlock, M.E.** (1998). The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* **76**: 1405-1420.
- Hu, C.H., Xu, Y., Xia, M.S., Xiong, L., Xu, Z.R.** (2007). Effects of Cu²⁺-exchanged montmorillonite on growth performance, microbial ecology and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* **270**: 200-206.
- Huge, A., Weber, E., Ehrlein, H.J.** (1995). Effects of enteral feedback inhibition on motility, luminal flow, and absorption of nutrients in proximal gut of minipigs. *Dig. Dis. Sci.* **40**: 1024-1034.
- Hunter, J.M.** (1973). Geophagy in Africa and in the United States: a culture-nutrition hypothesis. *Geographical Review.* **63**: 170-195.

- Hunter, J.M., De Kleine, R.** (1984). Geophagy in Central America. *Geographical Review*. **74**: 157-169.
- Huntington, G.B., Emerick, R.J. and Embry, L.B.** (1977a). Sodium bentonite or sodium bicarbonate as aids on feeding high-concentrate diets to lambs. *J. Anim. Sci.* **45**: 804-811.
- Huntington, G.B., Emerick, R.J. and Embry, L.B.** (1977b). Sodium bentonite effects when fed at various levels with high concentrate diets to lambs. *J. Anim. Sci.* **45**: 119-125.
- Jablonski, G., Klem, K.H., Danielsen C.C., Mosekilde, L., Gordeladze, J.O.** (1996). Aluminium-induced bone disease in uremic rats: Effect of deferoxamine. *Biosci. Rep.* **16**: 49-63.
- Johns, T.** (1986). Detoxification function of geophagy and domestication of the potato. *J. Chem. Ecol.* **12**: 635 -646.
- Johnson, V.J., Kim, S.H. and Sharma R.P.** (2004). Aluminum-maltolate induces apoptosis and necrosis in neuro-2a cells: potential role for p53 signalling. *Toxicol. Sci.* **83**: 329-339.
- Kaehny, W.D., Hegg, A.P. and Alfrey, A.C.** (1997). Gastrointestinal absorption of aluminium from aluminium-containing acids. *N. Engl. J. Med.* **296**: 1389-1390.
- Kanny, G., Grignon, G., Dauca, M., Guedenet, J.C., Moneret-Vautrin, D.A.** (1996). Ultrastructural changes in the duodenal mucosa induced by ingested histamine in patients with chronic urticaria. *Allergy*. **51**: 935-393.
- Kawase, M., Hayashi, Y., Kinoshita, F., Yamato, E., Miyazaki, J., Yamakawa, J., Ishida, T., Tamura, M., Yagi, K.** (2004). Protective effect of montmorillonite on plasmid DNA in oral gene delivery into small intestine. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 2049-2051.
- Keele, C.A., Neil, E. and Joels, N.** (1982). Samson Wright's applied physiology. New York/Toronto. Oxford University Press, thirteenth edition. 613 pp.
- Khalil, H.S.A., Abdelhakim, A.A.** (2002). Adsorption studies of fatty acids on montmorillonite-based filler clay. *J. Appl. Polym. Sci.* **86**: 2574 – 2580.
- Klaus, G., Schmid, B.** (1998). Geophagy at natural licks and mammal ecology: a review. *Mammalia*. **62**: 481-497.
- Klein, N., Frölich, F., Krief, S.** (2008). Geophagy: soil consumption enhances the bioactivities of plants eaten by chimpanzees. *Naturwissenschaften*. **95**: 325-331.
- Klionsky, D.J. et al.** (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. **4**: 151-175.

- Knezevich, M.** (1998). Geophagy as a therapeutic mediator of endoparasitism in a free-ranging group of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am. J. Primatol.* **44**: 71-82.
- Konturek, S.J., Konturek, J.W., Pawlik, T., Brzozowki, T.** (2004). Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J. Physiol. Pharmacol.* **55**: 137-154.
- Koubi, H., Robin, J., Deswasnes, G., Le Maho, Y., Frutoso, J., Minaire, Y.** (1991). Fasting induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol. Behav.* **50**: 337-342.
- Krishnamani, R., Mahaney, W.C.** (2000). Geophagy among primates: adaptive significance and ecological consequences. *Anim. Behav.* **59**: 899-915.
- Krysko, D.V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P.** (2007). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* **44**: 205-221.
- Kukulies, J., Naib-Majani, W., Komnick, H.** (1984). Coincident filament distribution and histochemical localization of F-actin in the enterocytes of the Larval Dragonfly *Aeshna cyanea*. *Protoplasma.* **121**: 157-162.
- Kurz, T., Terman, A., Brunk, U.T.** (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch. Biochem. Biophys.* **462**: 220-230.
- L'Hermite, A., Sine, J.P., Colas, B.** (1996). Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in epithelial cells of rat intestine. *Eur. J. Histochem.* **40**: 299-304.
- Laue, M., Kiefer, G., Pütz, N., Mestres, P.** (2005). Use of environmental scanning electron microscopy to study a resin block face. *Eur. Microsc. Anal.* **97**: 13-15.
- Laufer, B.** (1930). Geophagy. Publication 280, Anthropological Series, vol. 18. Field Museum of Natural History, Chicago, pp 99-198.
- Leeson, T.S.** (1982). The terminal web of the duodenal enterocyte. *J. Anat.* **134**: 653-666.
- Le Maho Y., Vu Van Kha, H., Koubi, H., Dewasmes, G., Girard, J., Ferre, P., Cagnard, M.** (1981). Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am. J. Physiol.* **241**: 342-345.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Quian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Herman, B.** (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta.* **1366**: 177-196.
- Lignot, J.H., Helmstetter, C., Secor, S.M.** (2005). Postprandial morphological response of the intestinal epithelium of the Burmese python (*Python molurus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **141**: 280-291.

- Lignot, J., Secor, S., Ackermann, A., Helmstetter, C.** (2008). Plasticity of the intestinal wall of various Boidae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **150**: 59-60.
- Liu, Y.L., Malik, N., Sanger, G.J., Friedman, M.I., Andrews, P.L.R.** (2005). Pica-A model of nausea? Species differences in response to cisplatin. *Physiol. Behav.* **85**: 271-277.
- Llobet, J.M., Domingo, J.L., Gomez, M., Tomas, J.M., Corbella, J.** (1987). Acute toxicity studies of aluminium compounds: antidotal efficacy of several chelating agents. *Pharmacol. Toxicol.* **60**: 280-283.
- Lorin, S., Codogno, P., Djavaheri-Mergny, M.** (2008). L'autophagie: un nouveau concept en cancérologie. *Bull. Cancer.* **95**: 43-50.
- Lukiw, W.J., Percy, M.E., Kruck, T.P.** (2005). Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture. *J. Inorg. Biochem.* **99**: 1895-1898.
- Luoba, A.I., Wenzel, G.P., Estambale, B., Ouma, J.H., Alusala, D., Ayah, R.** (2005). Earth-eating and reinfection with intestinal helminths among pregnant and lactating women in western Kenya. *Trop. Med. Int. Health.* **10**: 220-227.
- Ma, Y.L., Guo, T.** (2008). Intestinal morphology, brushborder and digesta enzyme activities of broilers fed on a diet containing Cu²⁺-loaded montmorillonite. *Brit. Poultry Sci.* **49**: 65-73.
- Mahaney, W. C., Zippin, J., Milner, M. W., Sanmugadas, K., Hancock, R. G. V., Aufreiter, S., Campbell, S., Huffman, M. A., Wink, M., Malloch, D., Kalm, V.** (1999). Chemistry, mineralogy and microbiology of termite mound soil eaten by the chimpanzees of the Mahale mountains, Western Tanzania. *J. Trop. Ecol.* **15**: 565-588.
- Mahaney, W.C., Krishnamani, R.** (2003). Understanding Geophagy in Animals: Standard Procedures for Sampling Soils. *J Chem. Ecol.* **29**: 1503-1523.
- Mahieu, S., Millen, N., González, M., Contini, M., del C. Elías, M.M.** (2005). Alterations of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration. *J. Inorg. Biochem.* **99**: 1858-1864.
- Mahraoui, L., Heyman, M., Plique, O., Droy-Lefaix, M.T., Desjeux, J.F.** (1997). Apical effect of diosmectite on damage to the intestinal barrier induced by basal tumour necrosis factor-alpha. *Gut.* **40**, 339-343.
- Marlow, R.W., Tollestrup, K.** (1982). Mining and natural exploitation of minerals deposits by the desert tortoise. *Gopherus agassizi. Anim. Behav.* **30**: 475-478.

- Martinez, M.E., Rodriguez, M., Frutos, M., Felsenfeld, A.J.** (1991). Effect of aluminium on osteocalcin production in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant.* **6**: 851-856.
- Martins, M.J., Hipolito-Reis, C., Azevedo, I.** (2001). Effect of fasting on rat duodenal and jejunal microvilli. *Cli. Nutr.* **20**: 325-331.
- Mascolo, N., Summa, V., Tateo, F.** (1999). Characterization of toxic elements in clays for human healing use. *Appl. Clay Sci.* **15** : 491-500.
- Mauras, Y., Renier, J.C., Tricard, A., Allain, P.** (1983). Mise en évidence de l'absorption gastro-intestinale du silicium à partir d'un amino-sillicate. *Thérapie.* **38**: 175-178.
- Mayhew, T.M., Middleton, C.** (1985). Crypts, villi and microvilli in the small intestine on the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *J. Anat.* **141**: 1-17.
- McMahon, L.R., Jones, S.L., Gilliland, T.R., Hall, W.D., Wellman, P.J.** (1999). Effects of ephedrine enantiomers on conditioned taste aversion and kaolin intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **63**: 119-124.
- Meier, P., Vousden, K.H.** (2007). Lucifer's labyrinth – Ten years of path finding in cell death. *Mol. Cell.* **28**: 746-754.
- Meley, D., Pattingre, S., Codogno, P.** (2006). Rôle des PI3 kinases dans le contrôle de l'autophagie. *Bull. Cancer.* **93**: 439-444.
- Millot, G.** (1964). Géologie des argiles : Altérations, Sédimentologie, Géochimie. Masson et Cie, Paris, p. 35.
- Mitchell, D., Laycock, J.D., Stephens, W.F.** (1977). Motion sickness induced pica in rat. *Am. J. Clin. Nutr.* **30**: 147-150.
- Moré, J., Bénazet, F., Fioramonti, J., Droy-Lefaix, M.T.** (1987). Effects of treatment with smectite on gastric and intestinal glycoproteins in the rat: a histochemical study. *Histochem. J.* **19**: 665-670.
- Morel, E., Demignot, S., Château, D., Chambaz, J., Rousset, M., Delers, F.** (2004). Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 132-141.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R.** (1997). Endocytosis. *Physiol. Rev.* **77**: 759-803.
- Mukherjee, S., Maxfield, F.R.** (2004). Lipid and cholesterol trafficking in NPC. *Biochem. Biophys. Acta.* **1685**: 28-37.
- Müller, K.H., Ahl, C., Hartmann, G.** (1997). Geophagy in Masked Titi Monkeys (*Callicebus personatus melanochir*) in Brazil. *Primates.* **38**: 69-77.

- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Siritto, M., Sawadogo, M., Kahn, A., Vaultont, S.** (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *PNAS*. **99**: 4596-4601.
- Orihuela, D., Meichtry, V., Pregi, N., Pizarro, M.** (2005). Short-term oral exposure to aluminium decreases glutathione intestinal levels and changes enzyme activities involved in its metabolism. *J. Inorg. Biochem.* **99**: 1871-1878.
- Pages, G., Lloyd, E., Suarez, S.A.** (2005). The impact of geophagy on ranging behaviour in Phayre's leaf monkeys (*Trachypithecus phayrei*). *Folia Primatol.* **76**: 342-346.
- Parrachini, V., Pedotti, P., Taioli, E.** (2005). Genetics of leptin and obesity: a huge review. *Am. J. Epidemiol.* **162**: 101-114.
- Patterson, E.C., Staszak, D.J.** (1977). Effects of geophagia (kaolin ingestion) on the maternal blood and embryonic development in the pregnant rat. *J. Nutr.* **107**: 2020-2025.
- Perl, D.P.** (1985). Relationship of aluminium to Alzheimers-disease. *Environ. Health Persp.* **63** : 149-153.
- Petit, V., Niot, I., Poirier, H., Besnard, P.** (2007 a). Absorption intestinale des acides gras : faits et incertitudes. *Nutr. Clin. Metabol.* **21**: 38-45.
- Petit, V., Arnould, L., Martin, P., Monnot, M., C., Pineau, T., Besnard, P., Niot, I.** (2007 b). Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J. Lipid Res.* **48**: 278-287.
- Petkova, E., Venkov, T., Chushkov, P., Encheva, I., Poshtakov, E.** (1981). Biochemical and hematological indices from the use of a bulgarben preparation in digestive disorders in calves. *Vet. Med. Nauki.* **18**: 28-33.
- Pichard, A., Bisson, M., Gay, G., Houeix, N., Jolibois, B., Lefevre, J.P., Magaud, H., Migné, V., Morin, A., Tissot, S., Gillet, C.** (2005). Aluminium et dérivés. INERIS – Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. *INERIS–DRC–02-25590-02DF41.doc*. Version N°2-2.
- Powell, J.J., Thompson, R.P.H.** (1993). The chemistry of aluminium in the gastrointestinal lumen and its uptake and absorption. *P. Nutr. Soc.* **52**: 241-253.
- Powell, J.J., Ainley, C.C., Evans, R., Thompson, R.P.H.** (1994). Intestinal perfusion of dietary levels of aluminium – Association with the lumen. *Gut.* **35**: 1053-1057.
- Quisenberry, J.H.** (1968). The use of clay in poultry feed. *Clay. Clay Miner.* **16**: 267-270.
- Rainville, A.J.** (1998). Pica practices of pregnant women are associated with lower maternal hemoglobin level at delivery. *J. Am. Diet. Assoc.* **98**: 293-296.

- Rautureau, M., Caillère, S., Henin, S.** (2004). Les argiles. Seconde édition. Septima. 97 p.
- Reffitt, D.M., Jugdaohsingh, R., Thompson, R.P.H., Powell, J.J.** (1999). Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. *J. Inorg. Biochem.* **76**: 141-147.
- Reiber, S., Kukull, W., Standish-Lee, P.** (1995). Drinking water aluminium and bioavailability. *J. Am. Water Works Assoc.* **87**: 86–100.
- Reichardt, F., Habold, C., Oudart, H., Ackermann, A., Boos, A., Hagege, A., Sabatier, L., Liewig, N., Lignot, J.H.** (2007). Clay complementation in rat diet: chronic effect of kaolinite on the intestinal lining. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* **146**: 186-187.
- Reichardt, F., Habold, C., Chaumande, B., Ackermann A., Ehret-Sabatier, L., Le Maho, Y., Angel, F., Liewig, N., Lignot, J.H.** Interactions between ingested kaolinite and the intestinal mucosa in rat: Proteomic and cellular evidences. *Fund. Clin. Pharmacol.* Sous presse.
- Richard, D., Anselme, B., Baehr, J.C., Chaffard, J., Méreaux, J., Périlleux, E., Valet, P.** (1997). Physiologie des animaux. Paris, Nathan. 2 tomes, 352 pp.
- Robin, J., Frain, M., Sardet, C., Groscolas, R., Le Maho, Y.** (1988). Protein and lipid utilization during long-term fasting in emperor penguins. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **254**: 61-68.
- Robin, J.P., Decrock, F., Herzberg, G., Mioskowski, E., Le Maho, Y., Bach, A., Groscolas, R.** (2008). Restoration of body energy reserves during refeeding in rats is dependant on both the intensity of energy restriction and the metabolic status at the onset of starvation. *J. Nutr.* **138**: 861-866.
- Rodriguez-Enriquez, S., He, L., Lemasters, J.J.** (2004). Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 2463-2472.
- Rudd J.A., Yamamoto, K., Yamatodani, A., Takeda, N.** (2002). Differential action of ondosteron and dexamethasone to modify cisplatin-induced acute and delayed kaolin consumption (« pica ») in rats. **454**: 47-52.
- Sabesin, M.S., Frase, S.** (1977). Electron microscope studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J. Lip. Res.* **18**: 496-511.
- Sakata, T.** (1986). Effects of indigestible dietary bulk and short chain fatty-acids on the tissue weight and epithelial-cell proliferation rate of the digestive-tract in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **32**: 355-362.

- Scarlatti, F., Granata, R., Meijer, A.J., Codogno, P.** (2008). Does autophagy have a licence to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 1-9.
- Schwartz, G.J., Moran, T.H.** (1998). Duodenal nutrient exposure elicits nutrient-specific gut motility and vagal afferent signals in rat. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **274**: 1236-1242.
- Simon, S.L.** (1998). Soil ingestion by humans: a review of history, data, and etiology with application to risk assessment of radioactively contaminated soil. *Health Phys.* **74**: 647-672.
- Sohma, M.** (1983). Ultrastructure of the absorptive cells in the small intestine of the rat during starvation. *Anat. Embryol.* **168**: 331-339.
- Southern, L.L., Ward, T.L., Bidner, T.D., Hebert, L.G.** (1994). Effect of sodium bentonite or hydrated sodium calcium aluminosilicate on growth performance and tibia mineral concentrations in broiler chicks fed nutrient-deficient diets. *Poult. Sci.* **73**: 848-854.
- Speakman, J. R., Visser, G. H., Ward, S., Krol, E.** (2008). The use of isotope dilution methods for the measurement of body composition. *In Body Composition Analysis of Animals: A Handbook of Non-Destructive Methods.* Eds. Speakman, J.R., Cambridge University Press, Vol. 1, 260 pp.
- Stoev, S.D., Grozeva, N., Hald, B.** (1998). Ultrastructural and toxicological investigations in spontaneous cases of porcine nephropathy in Bulgaria. *Veterinarski Archiv.* **68**: 39-49.
- Sutherland, J.E., Greger, J.L.** (1998). Effect of the size of an oral dose of aluminium on the relative importance of biliary v. urinary aluminium excretion in conscious rats. *Food Chem Toxicol.* **36**: 505-512.
- Takeda, N., Hasegawa, S., Morita, M., Matsunaga, T.** (1993). Pica in Rats Is Analogous to Emesis - an Animal-Model in Emesis Research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **45**: 817-821.
- Tateo, F., Summa, V.** (2006). Element mobility in clays for healing use. *Applied Clay Science.* **36**: 64-76.
- Tauquir, N.A., Nawaz, H.** (2001). Performance and economics of broiler chicks fed on rations supplemented with different levels of sodium bentonite. *Int. J. Agric. Biol.* **3**: 149-150.
- Theodorou, V., Fioramonti, J., Droy-Lefaix, M.T., Plique, O., Buéno, L.** (1994). Protective action of diosmectite treatment on digestive disturbances induced by intestinal anaphylaxis in the guinea-pig. *Aliment. Pharm. Ther.* **8**: 295-299.

- Thomson, A.B., Cheeseman, C.I., Keelan, M., Fedorak, R., Clandinin, M.T.** (1994). Crypt cell production rate, enterocyte turnover time and appearance of transport along the jejunal villus of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **1191**: 197-204.
- Thouzeau, C., Lemaho, Y., Laruechagiotis, C.** (1995). Refeeding in fasted rats - Dietary self-selection according to metabolic status. *Physiol. Behav.* **58**: 1051-1058.
- Trckova, M., Matlova, L., Dvorska, L., Pavlik, I.** (2004). Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. *Vet. Med. – Czech.* **49**: 389-399.
- Tso, P., Balint, J.A.** (1986). Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am. J. Physiol.* **250**: 715-726.
- Tso, P., Liu, M.** (2004). Ingested fat and satiety. *Physiol. Behav.* **81**: 275-287.
- Vacheret, N.** <http://www-rocq.inria.fr/who/Marc.Thiriet/Glosr/Bio/TubDigest/Intestinp.html>. Site internet consulté en septembre-octobre 2008.
- Van der Voet, G.B., De Wolff, F.A.** (1986). Intestinal absorption of aluminium in rats: effects of intraluminal pH and aluminium concentration. *J. Appl. Toxicol.* **6**: 37-41.
- Van der Voet, G.B., Brandsma, A., E., Heijink, E., De Wolff, F.A.** (1992). Accumulation of aluminium in rat liver: association with constituents of the cytosol. *Pharmacol. Toxicol.* **70**: 173-176.
- Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., S., Brière, R.** (1995). *Physiologie humaine*. Chenelière/McGraw-Hill, Montréal. 3ème éd. 1 volume, 814 pp.
- Varum, F.J., McConnell, E.L., Sousa, J.J., Veiga, F., Basit, A.W.** (2008). Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* **25**: 207-258.
- Vera, G., Chiarlone, A., Martin, M.I. and Abalo, R.** (2006). Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats. *Auton. Neurosci.* **126-127**: 81-92.
- Vermeer, D.E., Frate, D.A.** (1979). Geophagia in Rural Mississippi - Environmental and Cultural Contexts and Nutritional Implications. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**: 2129-2135.
- Vermeer, D.E., Ferrell R.E.J.** (1985). Nigerian geophagical clay: A traditional antidiarrheal pharmaceutical. *Science.* **227**: 634-636.
- Vicencio, J.M., Galluzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., Morselli, E., Younes, A.B., Maiuri, M.C., Lavandero, S., Kroemer, G.** (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path. A mini-review. *Gerontology.* **54**: 92-99.

- Vittori, D., Nesse, A., Pérez, G., Garbossa, G.** (1999). Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium. *J. Inorg. Biochem.* **76**: 113-120.
- Waheed, A.A., Gupta, P.D.** (1997). Changes in structural and functional properties of rat intestinal brush border membrane during starvation. *Life Sci.* **61**: 2425-2433.
- Wakibara, J.V., Huffman, M.A., Wink, M., Reich, S., Aufreiter, S., Hancock, R.G.V., Sodhi, R., Mahaney, W.C., Russel, S.** (2001). The adaptative significance of geophagy for Japanese Macaques (*Macaca fuscata*) at Arashiyama, Japan. *Int. J. Primatol.* **22**: 495-520.
- Walton, J., Tuniz, C., Fink, D., Jacobsen, G., Wilcox, D.** (1995). Uptake of trace amounts of aluminium into the brain in drinking water. *Neurotoxicology.* **16**: 187-190.
- Walton, J.R., Diamond, T.H., Kuma, S., Murrell, G.A.C.** (2007). A sensitive stain for aluminum in undecalcified cancellous bone. *J. Inorg. Biochem.* **101**: 1285-1290.
- Weberg, R., Berstad, A.** (1986). Gastrointestinal absorption of aluminum from single doses of aluminum containing antacids in man. *Eur. J. Clin. Invest.* **16**: 428-432.
- Whitehead, M.W., Farrar, G., Christie, G.L., Blair, J.A., Thompson, R.P., Powell, J.J.** (1997). Mechanisms of aluminium absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**: 1446-1452.
- Williams, L.B., Holland, M., Eberl, D.D., Brunet, T., Brunet de Courrsou, L.** (2004). Killer clays! Natural antibacterial clay minerals. *Mineral. Soc. Bull.* **139**: 3-8.
- Wilson, M.J.** (2003). Clay mineralogical and related characteristics of geophagic materials. *J. Chem. Ecology.* **29**: 1525-1547.
- Winkhofer, C., Steinhausen, C., Beck, E., Alvarez-Bruckmann, M., Kinzel, S., Ittel, T.H., Nolte, E.** (2000). Effect of iron status on the absorption, speciation and tissue distribution of aluminium in rats. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* **172**, 920-924.
- Woywodt, A.** (2002). Geophagia: the history of earth-eating. *J. R. Soc. Med.* **95**: 143-146.
- Wu, A.L., Clark, S.B., Holt, P.R.** (1975). Transmucosal triglyceride transport rates in proximal and distal rat intestine in vivo. *J. Lipid Res.* **16**: 251-257.
- Xia, M.S., Hu, C.H., Xu, Z.R.** (2004). Effects of copper-bearing montmorillonite on growth performance, digestive enzyme activities, and intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Sci.* **83**: 1868-1875.
- Xing, J., Chen, J.D.Z.** (2004). Alterations of gastrointestinal motility in obesity. *Obes. Res.* **12**: 1723-1732.

- Xu, J., Chen, J.D.Z.** (2008). Effects of sibutramine on gastric emptying, intestinal motility and rectal tone in dogs. *Dig. Dis. Sci.* **53**: 155-162.
- Yamada, K., Shinohara, H., Hyodo, R., Soneda, F., Sugiyama, M., Moriuchi, S., Yamada, N., Osumi, M., Hosoya, N.** (1986). Adaptative changes of sugar absorption in rat small intestine during fasting and refeeding. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **1**: 39-51.
- Yamamoto, K., Takeda, N., Yamatodani, A.** (2002). Establishment of an animal model for radiation-induced vomiting in rats using pica. *J. Radiat. Res.* **43**: 135-141.
- Yamamoto, K., Ngan, M. P., Takeda, N., Yamatodani, A., Rudd, J.A.** (2004). Differential activity of drugs to induce emesis and pica behavior in *Suncus murinus* (house musk shrew) and rats. *Physiol. Behav.* **83**: 151-156.
- Yang, P.C., Berin, M.C., Yu, L., Perdue, M.H.** (2001). Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat. *Am. J. Pathol.* **158**: 681-690.
- Yeşiloğlu, Y.** (2005). Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry.* **40**: 2155-2159.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Aras rouges et bleus (<i>Ara macao</i> et <i>Ara rauna</i>) consommant de l'argile sur un affleurement de falaise en Amazonie. (Photo Christian D. Müller).....	10
Figure 2. Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>) ramassant la terre d'une termitière.....	11
Figure 3. Singe hurleur (<i>Alouatta palliata</i>) consommant de l'argile sur un affleurement de falaise en Amazonie. (Photo Christian D. Müller)	12
Figure 4. Vente de médicaments à base d'argile dans un marché en Ouganda. (D'après Abrahams, 1997).....	13
Figure 5. Schéma général de la structure des grands groupes de minéraux argileux.	21
Figure 6 : Représentation schématique des structures en feuillets des argiles.	21
Figure 7. Répartitions terrestres des argiles. Hydrolyse et zonation climatique. (D'après Allen, 1997)	25
Figure 8. Caractéristiques de la kaolinite et de la montmorillonite.....	26
Figure 9. Schéma représentant le tube digestif chez le rat.	30
Figure 10. Villosités et microvillosités de rat.....	31
Figure 11. Schéma représentant la disposition interne de l'intestin en vue transversale. (N. Vacheret, UCB Lyon, site internet consulté en 2008)	32
Figure 12. Structure des villosités intestinales de rats.....	35
Figure 13. Représentation schématique des circulations sanguine et lymphatique et de l'innervation d'une villosité intestinale.....	36
Figure 14. Schéma et image en MET d'un entérocyte avec ses constituants cellulaires. Ref ?	37
Figure 15. Schéma et image en MET de la structure des microvillosités.	39
Figure 16. Schéma des différentes cellules retrouvées dans l'intestin grêle.....	40
Figure 17. Schéma représentant les différentes voies d'absorption des nutriments par des entérocytes. (d'après N. Vacheret, UCB Lyon, site internet consulté en 2008)	44
Figure 18. Schéma explicatif des deux axes suivis dans cette étude.....	52
Figure 19. Pourcentages de kaolinite ingérée par les animaux Kao28.....	74
Figure 20. Suivi des masses des animaux NF28, Kao28 et MMT28.....	75
Figure 21. Pourcentage de kaolinite et de montmorillonite dans la fraction solide totale ingérée.....	75
Figure 22. Consommation en kaolinite lors de la mise sur grille.....	76
Figure 23. Taux journalier de perte de masse corporelle dM / Mdt (g / kg / jour) chez un rat NF+P3 et un rat Kao7 + P3Kao.....	77
Figure 24. Consommation en kaolinite des rats Kao7+P3Kao.....	77
Figure 25. Consommation en croquettes des rats.....	78
Figure 26. Consommation en kaolinite des rats RéaKao1 et RéaKao2.....	79
Figure 27. Durée de réalimentation des rats RéaKao2 et RéaNF(-).....	79
Figure 28. Gain moyen durant la réalimentation des rats RéaKao2 et RéaNF(-).....	79
Figure 29. Gains de masse corporelle chez les animaux NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	80
Figure 30. Consommation de croquettes des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	81
Figure 31. Consommation de kaolinite des rats Kao14 et Kao14-.....	81
Figure 32. Pourcentage en eau des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.....	82
Figure 33. Masses lipidiques RéaNF, RéaKao et RéaNF-.....	82
Figure 34. Masses minérales RéaNF, RéaKao et Réa NF-.....	82
Figure 35. Kaolinite témoin et échantillons de jéjunum des rats Kao28 observés par ESEM.....	85
Figure 36. Analyses ESEM/EDX sur un échantillon de kaolinite témoin.....	86
Figure 37. Analyses ESEM/EDX sur des échantillons de jéjunum des rats Kao28.....	87
Figure 38. Analyses ESEM/EDX sur des échantillons de jéjunum des rats Kao28.....	88
Figure 39. Images CSEM de particules de kaolinite témoin et d'échantillons de jéjunum des rats Kao28.....	89
Figure 40. Images ESEM d'échantillons de jéjunum des rats MMT28.....	91
Figure 41. Analyses ESEM/EDX sur un échantillon de montmorillonite témoin.....	92

Figure 42. Analyses ESEM/EDX d'échantillons de jéjunum des rats MMT28.....	93
Figure 43. Images CSEM d'échantillons de jéjunum des rats MMT28.....	95
Figure 44. Images ESEM d'échantillons de jéjunum des rats Kao28 et MMT28. Analyses ESEM/EDX.....	97
Figure 45. Images ESEM d'échantillons de jéjunum des rats Kao7+P3Kao.....	99
Figure 46. Analyses ESEM/EDX de chyme intestinal.....	100
Figure 47. Images CSEM de fèces de rats Kao7+P3Kao.....	101
Figure 48. NF14 et NF28 (1).....	103
Figure 49. NF14 et NF28 (2).....	105
Figure 50. Kao7, Kao14 et Kao28 (1).....	107
Figure 51. Kao7, Kao14 et Kao28 (2).....	109
Figure 52. Kao14.....	111
Figure 53. Kao14 et Kao28.....	113
Figure 54. MMT28.....	115
Figure 55. NF+P3, Kao7+P3 et Kao7+P3Kao.....	117
Figure 56. RéaNF et RéaNF-.....	119
Figure 57. RéaKao (1).....	121
Figure 58. RéaKao (2).....	123
Figure 59. NF14(-).....	125
Figure 60. Kao14(-).....	127
Figure 61. Largeur des villosités des rats NF28, Kao7 et Kao28.....	129
Figure 62. Longueur des microvillosités des rats NF28, Kao7 et Kao28.....	129
Figure 63. Longueur des microfilaments d'actine des rats NF28, Kao7 et Kao28.....	130
Figure 64. Longueur des microvillosités des rats NF28, Kao28 et MMT28.....	130
Figure 65. Longueur des microvillosités des rats NF+P3, Kao7+P3Kao et Kao7+P3.....	131
Figure 66. Longueur des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.....	132
Figure 67. Largeurs des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.....	132
Figure 68. Densités des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.....	132
Figure 69. Surface des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.....	133
Figure 70. Volume des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF-.....	133
Figure 71. Longueur des villosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	133
Figure 72. Largeur des villosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	133
Figure 73. Longueurs des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	134
Figure 74. Largeurs des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	134
Figure 75. Densité des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	135
Figure 76. Longueur des racines des microfilaments d'actine des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	135
Figure 77. Longueur totale des filaments d'actine des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	135
Figure 78. Volume des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14- et Kao14-.....	136
Figure 79. Concentration en aluminium dans différents tissus des rats NF28, Kao28 et MMT28.....	137
Figure 80. Teneurs en aluminium après 75 jours de complémentation en kaolinite chez des rats Long Evans.....	138
Figure 81. Concentration en leptine plasmatique des rats.....	139
Figure 82. Schéma représentant la cinétique de réduction des microvillosités lors de la complémentation sur le long terme.....	163
Figure 83. Schéma explicatif de la macroautophagie.....	168
Figure 84. Schéma récapitulatif des phénomènes d'autophagie et d'inflammation mis en place lors d'ingestion de kaolinite.....	172
Figure 85. Schéma récapitulatif des résultats obtenus et des hypothèses émises dans cette étude.....	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau O- 1. Classification des phyllosilicates recommandée par l'AIPEA	23
Tableau O- 2. Principaux minéraux argileux des sols (Stengel et Gelin, 1998).....	23
En annexe :	
Tableau 1-1. Expérience 1a: rats NF28, Kao7 et Kao28.	207
Tableau 1-2. Expérience 1a: rats NF28, Kao28 et MMT28.	207
Tableau 1-3. Effet grille.	207
Tableau 1-4. Expérience 2: rats NF+P3, Kao7+P3 et Kao7+P3Kao.....	208
Tableau 1-5. Expérience 3: rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).....	208
Tableau 1-6. Expérience 4: rats NF14, Kao14, NF14(-) et Kao14(-).....	208
Tableau 2- 1. Analyses des compositions corporelles des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).....	209
Tableau 3.1- 1. Données morphométriques des villosités et des entérocytes des rats NF28, Kao7 et Kao28.	210
Tableau 3.1- 2. Données morphométriques des microvillosités des rats NF28, Kao7 et Kao28.	210
Tableau 3.2- 1. Données morphométriques des villosités des rats NF28, Kao28 et MMT28.....	211
Tableau 3.2- 2. Données morphométriques des microvillosités des rats NF28, Kao28 et MMT28... 211	
Tableau 3.3- 1. Effets de l'ingestion de kaolinite sur la bordure en brosse au moment de l'entrée dans la phase III du jeûne.....	212
Tableau 3.4- 1. Données morphométriques des villosités et des entérocytes des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).....	212
Tableau 3.4- 2. Données morphométriques des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).	212
Tableau 3.5- 1. Mesures morphologiques des villosités des rats NF14, Kao14, NF14(-) et Kao14(-).	213
Tableau 3.5- 2. Mesures morphologiques des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14(-) et Kao14(-).....	213
Tableau 4- 1. Teneurs en aluminium dans le sang, le foie, les reins, le cerveau et les os chez les rats NF28, Kao28 et MMT28 (µg/g).	214
Tableau 4- 2. Teneurs en aluminium dans le lyophilisat des rats RéaNF, RéaKao1, RéaKao2 et RéaNF(-) (µg/g).....	214
Tableau 5- 1. Teneurs en sérotonine dans le plasma des rats NF28 et Kao28.	215
Tableau 5- 2. Teneurs en leptine dans le plasma des rats NF28 et Kao28.	215

ANNEXES

1. Gain de masse et consommation de croquettes et de kaolinite

ANOVA, test post-hoc de Tukey. Les moyennes dans les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes, $P = 0,05$.

Tableau 1-1. Expérience 1a: rats NF28, Kao7 et Kao28.

Groupe	N	Gain de masse (g)	Consommation croquettes (g/j)	Consommation kaolinite (g/j)	% de kaolinite ingérée
NF28	5	97,02 ± 10,54 ^a	24,44 ± 1,59 ^a	-	-
Kao7	5	19,26 ± 5,27 ^b	21,74 ± 2,14 ^b	1,93 ± 1,72 ^a	9,44 ± 9,22 ^a
Kao28	10	93,24 ± 16,32 ^a	25,56 ± 2,57 ^a	1,1 ± 0,4 ^a (n=8)	4,51 ± 2,71 ^a (n=8)

Tableau 1-2. Expérience 1a: rats NF28, Kao28 et MMT28.

Groupes	N	Gain de masse (g)	Consommation croquette (g/j)	Consommation argile (g/j)	% d'argile ingérée
NF28	10	106,9 ± 26,8 ^a	22,42 ± 0,53 ^a	-	-
Kao28	10	106,3 ± 20,4 ^a	22,19 ± 0,59 ^a	1,60 ± 1,63 ^a	5,27 ± 3,61 ^a
MMT28	10	104,3 ± 8,3 ^a	23,08 ± 0,48 ^b	1,27 ± 1,04 ^a	6,06 ± 5,41 ^a

Tableau 1-3. Effet grille.

Les rats Kao7 et Kao28 ont découvert l'argile en même temps qu'ils étaient mis sur grille. Les rats Kao7+P3Kao et Kao7+P3 ont d'abord été mis sur grille pendant 4 jours avant d'être complémenté.

Test Mann-Whitney.

Groupes	N	Premier jour (g/j)	Second jour (g/j)	Troisième jour (g/j)	Quatrième jour (g/j)
Kao7 Kao28	15	9,96 ± 6,29 ^a	4,09 ± 3,02 ^a	1,78 ± 1,89 ^a	0,11 ± 1,88 ^a
Kao7+P3 Kao7+P3Kao	10	0,92 ± 0,84 ^b	0,11 ± 0,76 ^b	0,34 ± 0,59 ^b	0,07 ± 0,51 ^a

Tableau 1-4. Expérience 2: rats NF+P3, Kao7+P3 et Kao7+P3Kao.

Groupes	N	Consommation croquette sur les 7 premiers jours (g/j)	Consommation kaolinite (g/j)	% kaolinite ingérée	Durée de jeûne (j)	Perte de masse (g)	Consommation kaolinite P3 (g)
NF+P3	5	24,02 ± 1,27 ^a	-	-	9,05 ± 1,43 ^a	136,46 ± 5,89 ^a	-
Kao7+P3	5	24,50 ± 2,10 ^a	1,11 ± 0,90 ^a	4,69 ± 3,95 ^a	8,40 ± 0,89 ^a	124,76 ± 14,39 ^a	-
Kao7+P3Kao	5	23,93 ± 0,69 ^a	1,59 ± 1,10 ^a	6,76 ± 4,77 ^a	9,20 ± 0,83 ^a	135,36 ± 8,57 ^a	3,39 ± 2,55

Tableau 1-5. Expérience 3: rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).

Groupes	N	Durée de retour à masse pré-jeûne (j)	Gains de masse (g)	Gains journaliers (g/j)	Consommation croquettes (g/j)	Consommation kaolinite (g/j)	Kaolinite ingérée (%)
RéaNF	9	9,22 ± 1,09 ^a	134,45 ± 10,23 ^a	14,69 ± 1,41 ^a	28,18 ± 1,44 ^a	-	-
RéaKao1	9	9,22 ± 1,39 ^a	128,92 ± 11,63 ^a	14,26 ± 2,46 ^a	26,59 ± 1,23 ^b	1,40 ± 0,41	5,16 ± 1,20
RéaKao2	7	9,28 ± 1,11 ^a	133,75 ± 6,61 ^a	14,54 ± 1,46 ^a	28,74 ± 1,69 ^a	1,29 ± 0,51	4,15 ± 1,51
RéaNF(-)	13	11,00 ± 1,08 ^b	132,75 ± 10,35 ^a	12,12 ± 1,00 ^b	28,26 ± 1,93 ^a	-	-

Tableau 1-6. Expérience 4: rats NF14, Kao14, NF14(-) et Kao14(-).

Groupe	N	Gain de masse (g)	Consommation croquette (g/j)	Consommation kaolinite (g/j)	Kaolinite ingérée (%)
NF14	6	42,76 ± 8,85 ^a	24,17 ± 1,30 ^a	-	-
Kao14	6	50,41 ± 6,68 ^a	24,87 ± 1,26 ^a	1,50 ± 0,58	5,67 ± 2,08
NF14(-)	6	- 2,71 ± 7,68 ^a	17,74 ± 0,54 ^b	-	-
Kao14(-)	6	- 2,96 ± 6,27 ^a	17,61 ± 0,73 ^b	0,75 ± 0,26	4,09 ± 1,32

2. Composition corporelle

ANOVA, test post-hoc de Tukey. Les moyennes dans les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes, $P = 0,05$.

Tableau 2- 1. Analyses des compositions corporelles des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).

Groupes	N	Masse Euthanasie (g)	Eau %	Masse Lipide (g)	Masse Minérale (g)
RéaNF	9	381,39 ± 5,94 ^a	67,13 ± 1,18 ^{a,b}	31,89 ± 4,83 ^{a,b}	12,92 ± 0,54 ^{a,b}
RéaKao	16	381,21 ± 3,50 ^a	67,74 ± 1,30 ^a	30,01 ± 5,26 ^a	13,40 ± 0,62 ^a
RéaNF(-)	13	382,47 ± 7,90 ^a	66,28 ± 1,17 ^b	36,01 ± 5,43 ^b	12,65 ± 0,57 ^b

3. Mesures morphologiques

ANOVA, test post-hoc de Tukey. Les moyennes dans les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes, $P = 0,05$.

3.1. Expérience 1b

Tableau 3.1- 1. Données morphométriques des villosités et des entérocytes des rats NF28, Kao7 et Kao28.

Groupes	N	Villosités		Entérocytes
		Longueur (μm)	Largeur (μm)	Largeur (μm)
NF28	5	370,90 \pm 40,43 ^a	66,54 \pm 4,07 ^a	5,40 \pm 0,47 ^a
Kao7	5	372,68 \pm 33,74 ^a	68,94 \pm 2,29 ^a	4,77 \pm 1,19 ^a (n=4)
Kao28	9	398,19 \pm 62,91 ^a	76,13 \pm 7,13 ^a	4,87 \pm 1,40 ^a

Tableau 3.1- 2. Données morphométriques des microvillosités des rats NF28, Kao7 et Kao28.

Groupes	N	Longueur (μm)	Densité (nbre $\mu\text{villo.}/\mu\text{m}$)	Longueur racines filament d'actine (μm)	Longueur filament d'actine (μm)
NF28	5	1,53 \pm 0,18 ^a	8,27 \pm 1,07 ^a	0,25 \pm 0,02 ^a	1,78 \pm 0,18 ^a
Kao7	5	1,38 \pm 0,22 ^{a,b}	8,33 \pm 1,59 ^a	0,26 \pm 0,02 ^a	1,64 \pm 0,22 ^{a,b}
Kao28	9	1,20 \pm 0,13 ^b	8,94 \pm 1,90 ^a	0,27 \pm 0,03 ^a	1,48 \pm 0,15 ^b

3.2. Expérience 1b

Tableau 3.2- 1. Données morphométriques des villosités des rats NF28, Kao28 et MMT28.

Groupes	N	Longueur (µm)	N	Largeur (µm)
NF28	6	398,08 ± 139,60 ^a	8	50,04 ± 5,61 ^a
Kao28	6	373,15 ± 61,63 ^a	8	54,00 ± 8,84 ^a
MMT28	6	401,83 ± 88,33 ^a	8	57,05 ± 7,03 ^a

Tableau 3.2- 2. Données morphométriques des microvillosités des rats NF28, Kao28 et MMT28.

Groupes	N	Longueur (µm)	Largeur (µm)	Densité (nbr µv/µm)	Surface (µm ²)	Volume (µm ³)
NF28	5	1,51 ± 0,13 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	8,06 ± 0,63 ^a	0,57 ± 0,10 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
Kao28	4	1,36 ± 0,04 ^b	0,12 ± 0,01 ^a	7,85 ± 0,68 ^a	0,49 ± 0,04 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
MMT28	5	1,36 ± 0,07 ^b	0,13 ± 0,01 ^a	7,62 ± 0,82 ^a	0,57 ± 0,05 ^a	0,02 ± 0,01 ^a

3.3. Expérience 2

Tableau 3.3- 1. Effets de l'ingestion de kaolinite sur la bordure en brosse au moment de l'entrée dans la phase III du jeûne.

Groupes	N	Microvillosités	
		Longueur (µm)	Densité (nbr µv/µm)
NF+P3	4	1,67 ± 0,21 ^a	9,34 ± 0,53 ^a
Kao7+P3Kao	5	1,36 ± 0,18 ^{a,b}	9,07 ± 0,32 ^a
Kao7+P3	5	1,26 ± 0,22 ^b	9,31 ± 0,36 ^a

3.4. Expérience 3

Tableau 3.4- 1. Données morphométriques des villosités et des entérocytes des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).

Groupes	N	Villosités		Entérocytes
		Longueur (µm)	Largeur (µm)	Largeur (µm)
RéaNF	9	545,36 ± 47,34 ^a (n=7)	60,12 ± 5,06 ^a	6,16 ± 1,17 ^a
RéaKao	16	503,65 ± 79,74 ^a	62,76 ± 4,60 ^a	6,49 ± 1,27 ^a
RéaNF(-)	13	471,05 ± 114,01 ^a (n=12)	59,82 ± 6,05 ^a	6,97 ± 1,88 ^a

Tableau 3.4- 2. Données morphométriques des microvillosités des rats RéaNF, RéaKao et RéaNF(-).

Groupes	N	Longueur (µm)	Largeur (µm)	Densité (nbr µv/µm)	Surface (µm ²)	Volume (µm ³)
RéaNF	8	1,57 ± 0,10 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	8,13 ± 0,68 ^a	0,55 ± 0,06 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
RéaKao	15	1,24 ± 0,14 ^b (n=16)	0,13 ± 0,01 ^b	7,49 ± 0,49 ^b (n=16)	0,54 ± 0,04 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
RéaNF(-)	13	1,48 ± 0,16 ^a	0,13 ± 0,01 ^b	7,32 ± 0,66 ^b	0,60 ± 0,07 ^b	0,02 ± 0,01 ^b

3.5. Expérience 4

Tableau 3.5- 1 Mesures morphologiques des villosités des rats NF14, Kao14, NF14(-) et Kao14(-).

Groupes	N	Longueur (µm)	N	Largeur (µm)
NF14	3	380,24 ± 18,91 ^a	4	76,06 ± 7,99 ^a
Kao14	3	371,93 ± 13,52 ^a	5	74,47 ± 6,10 ^a
NF14(-)	3	291,17 ± 42,43 ^b	4	57,55 ± 7,14 ^b
Kao14(-)	3	309,64 ± 8,17 ^b	4	60,62 ± 5,37 ^b

Tableau 3.5- 2. Mesures morphologiques des microvillosités des rats NF14, Kao14, NF14(-) et Kao14(-).

Groupes	N	Longueur (µm)	Largeur (µm)	Densité (nbr µv/µm)	Surface (µm ²)	Volume (µm ³)	Racine filament actine (µm)	Longueur actine (µm)
NF14	6	1,46 ± 0,13 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	7,04 ± 0,51 ^a	0,71 ± 0,10 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,31 ± 0,03 ^a	1,77 ± 0,14 ^a
Kao14	6	1,24 ± 0,12 ^b	0,15 ± 0,01 ^a	6,70 ± 0,76 ^a	0,60 ± 0,06 ^a	0,02 ± 0,01 ^{a,b}	0,37 ± 0,02 ^b	1,61 ± 0,11 ^a
NF14(-)	6	1,89 ± 0,15 ^c	0,12 ± 0,01 ^b	7,86 ± 0,32 ^b	0,69 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,01 ^b	0,29 ± 0,05 ^a	2,18 ± 0,17 ^b
Kao14(-)	6	1,55 ± 0,09 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	6,70 ± 0,27 ^a	0,67 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,01 ^{a,b}	0,30 ± 0,03 ^a	1,85 ± 0,09 ^a

4. Teneurs en aluminium

ANOVA, test post-hoc de Tukey. Les moyennes dans les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes, $P = 0,05$.

Tableau 4- 1. Teneurs en aluminium dans le sang, le foie, les reins, le cerveau et les os chez les rats NF28, Kao28 et MMT28 ($\mu\text{g/g}$).

Groupes	N	Sang	Foie	Cerveau	Rein	Os
NF28	8	$1,78 \pm 1,05^a$	$6,39 \pm 5,27^a$	$1,81 \pm 0,99^a_{(n=6)}$	$4,08 \pm 3,20^a_{(n=9)}$	$4,60 \pm 3,25^a$
Kao28	10	$3,83 \pm 1,50^b$	$23,17 \pm 13,47^b_{(n=9)}$	$12,28 \pm 16,16^a_{(n=9)}$	$4,84 \pm 4,13^a$	$11,64 \pm 12,26^a$
MMT28	10	$0,59 \pm 0,68^a_{(n=9)}$	$4,96 \pm 1,24^a$	$3,82 \pm 2,0^a$	$4,85 \pm 1,76^a$	$4,90 \pm 2,39^a$

Tableau 4- 2. Teneurs en aluminium dans le lyophilisat des rats RéaNF, RéaKao1, RéaKao2 et RéaNF(-) ($\mu\text{g/g}$).

Groupe	N	Lyophilisat
RéaNF	9	$15,96 \pm 6,00^a$
RéaKao1	9	$56,41 \pm 33,46^b$
RéaKao2	7	$76,83 \pm 25,37^a$
RéaNF(-)	13	$9,89 \pm 5,23^b$

5. Teneurs en sérotonine et en leptine

ANOVA, test post-hoc de Tukey. Les moyennes dans les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes, $P = 0,05$.

Tableau 5- 1. Teneurs en sérotonine dans le plasma des rats NF28 et Kao28.

Groupe	N	Sérotonine (nM/ml)
NF28	10	40,04 ± 1,20 ^a
Kao28	9	39,66 ± 1,42 ^a

Tableau 5- 2. Teneurs en leptine dans le plasma des rats NF28 et Kao28.

Groupe	N	Leptine (pg/ml)
NF14	5	207,42 ± 42,03 ^a
Kao7	4	187,36 ± 0,55 ^a
Kao14	5	219,91 ± 49,02 ^a
Kao28	5	378,78 ± 118,88 ^b

Liste des publications et des communications

Articles - Revues de Rang A

- Habold C., **Reichardt F.**, Foltzer-Jourdainne C., Lignot J.H. (2007). Morphological changes of the rat intestinal lining in relation to body stores depletion during fasting and after refeeding. *Pflugers Arch.* **455**: 323-332.
- **Reichardt, F.**, Habold, C., Chaumande, B., Ackermann A., Ehret-Sabatier, L., Le Maho, Y., Angel, F., Liewig, N. and Lignot, J.H. (2009) Interactions between ingested kaolinite and the intestinal mucosa in rat: Proteomic and cellular evidences. *Fund. Clin. Pharmacol.* **29**-1, 69-79.
- Habold C., **Reichardt F.**, Le Maho Y., Liewig N., Lignot. J.H., Oudart H. Clay ingestion enhances triglyceride hydrolysis and non-esterified fatty acids absorption. *Brit. J. Nutr.* Sous presse.

Résumés de Congrès - Revues de Rang A

- Habold C., **Reichardt F.**, Ackermann A., Oudart H., Liewig N., Lignot J.-H. (2007) Does clay ingestion facilitate or reduce intestinal absorption ? Example of kaolinite. *J. Physiol.Biochem.* **63** (1), p.56.
- **Reichardt F.**, Habold C., Oudart H., Ackermann A., Boos A., Hagege A., Sabatier L., Liewig N., Lignot J.-H. (2007) Clay complementation in rat diet: Chronic effect of kaolinite on the intestinal lining. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **146** (4, Supplement 1): S186-S187.
- **Reichardt, F., Chaumande, B., Habold, C., Robin, J., Ackermann, A., Boos, A., Angel, F., Sabatier, L., Lignot J.H. and Liewig, N.** (2008). Effects of a kaolinite complementation on rat intestine during refeeding following prolonged fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* **150**: 62.

Présentations orales

- 01 **Reichardt F.**, Habold C., Chaumande B., Ackermann A., Oudart H., Ehret-Sabatier L., Boos A., Hagege A., Le Maho Y., Liewig N., Lignot J.-H. (2007) Effets d'une complémentation en kaolinite et en montmorillonite sur la muqueuse intestinale chez le rat. Journée des doctorants du Groupe Français des Argiles, Ecole des Mines, Paris, 19/12/2007, oral
- 02 Journée des Doctorants de l'IPHC (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien), 31 Janvier 2008, Strasbourg. Equipe de Physiologie Energétique. Présentation orale collective:
- 03 **Reichardt F.**, Habold C., Chaumande B., Ackermann A., Oudart H., Ehret-Sabatier L., Boos A., Hagege A., Le Maho Y., Liewig N., Lignot.J.H. (2008) Interaction argile/muqueuse intestinale chez le rat. 1. Modifications morphologiques de la muqueuse et risque toxicologique après complémentation en kaolinite et montmorillonite. RST et 6^e colloque GFA, Nancy, 21-24 avril 2008, oral.
- 04 Chaumande B., **Reichardt F.**, Ackermann A., Oudart H., Boos A., Hagege A., Le Maho Y., Liewig N., Lignot.J.H., Ehret-Sabatier L., Habold C. (2008) Interaction argile/muqueuse intestinale chez le rat. 2. Augmentation de l'absorption lipidique et restructuration morphologique sous l'effet de la kaolinite. RST et 6^e colloque GFA, Nancy, 21-24 avril 2008, oral.
- 05 **Reichardt F.**, Chaumande B., Habold C., Ackermann A., Robin J.P, Sabatier L, Boos A., Le Maho Y., Liewig N., Lignot J.H. (2008) Effects of a kaolinite complementation on rat intestine during refeeding following prolonged fasting. Society for Experimental Biology, SEB 2008 Marseilles, 6-10 juillet, oral

Présentations par posters

- 01 Chaumande B., Huillet C., Sabatier L., Bertile F., Van Dorsselaer A., Lignot J.H., Liewig N., Habold C., **Reichardt F.**, Le Maho Y. (2006) : Les argiles dans la restauration fonctionnelle de l'intestin : analyse protéomique et métallomique. Journée « Métaux et Biologie : aspects chimiques et biologiques ». Strasbourg - 07/12/2006.
- 02 Habold C., **Reichardt F.**, Ackermann A., Oudart H., Liewig N., Lignot J.-H. (2007) Does clay ingestion facilitate or reduce intestinal absorption ? Example of kaolinite. EITG 2007, March 03-06, Oberwiesenthal, Germany (25th Meeting European Intestinal Transport Group).
- 03 **Reichardt F.**, Habold C., Oudart H., Ackermann A., Liewig N., Lignot J.-H. (2007) Clay complementation in rat diet : chronic effect of kaolinite on the intestinal lining. SEB 2007, Glasgow, 31st march – 4th april (Society for Experimental Biology). *Distinction : Young Scientist Poster Award of the Animal Section*
- 04 **Reichardt F.**, Habold C., Oudart H., Ackermann A., Chaumande B., Sabatier L., Hagège A., Boos A., Liewig N. Lignot J.-H. (2007) Interactions entre kaolinite et muqueuse intestinale chez le rat lors d'une supplémentation argileuse. 5e Colloque GFA (Groupe français des Argiles), Mulhouse, 18-19 avril 2007, *Distinction : Prix Olmix - Line Brunet de Coursou pour le meilleur poster catégorie Interactions Argile - Vivant*
- 05 Chaumande B., Hagège A., Boos A., Sabatier L., Lignot J.H., Liewig N., **Reichardt F.**, Habold C., Le Maho Y. Bertile F., Van Dorsselaer A. (2007) Clay complementation in rat diet: effect of kaolinite on intestinal cells. SFEAP Pau 2007. Congrès de la société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique – 24^{ème} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse. Pau 2007- Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique. 17-20 septembre.

Vulgarisation – Grand Public

Participation à la fête de la science 2006, 13-15 octobre Strasbourg (**Reichardt F.**, Liewig N., Habold C., Lignot J.H., Le Maho Y.) :

Poster : De l'organe à la cellule... Zoom microscopique sur l'intestin.

Diaporama : Nutrition, Dénutrition, Réalimentation : Interactions Intestin-Argile chez le Rat de laboratoire.

Rapports à diffusion restreinte

- **Projet ANR Proteonutr 2005-2008 (avancement semestriel)**

Juin 2006 / Décembre 2006 / Juin 2007 / Février 2008 / Septembre 2008

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS	3
INTRODUCTION.....	5
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	7
1. L'INGESTION D'ARGILE.....	9
1.1. La géophagie	9
A. Définition.....	9
B. La géophagie dans la Nature	9
C. La géophagie humaine	12
1.2. Les effets associés à l'ingestion d'argile	14
A. La supplémentation minérale.....	14
B. La protection intestinale.....	15
1) Élimination des toxines contenues dans l'alimentation	15
2) Nausée et vomissement.....	16
C. L'augmentation de l'efficacité alimentaire	17
2. ARGILES ET MINÉRAUX ARGILEUX.....	19
2.1. Définition et nomenclature	19
A. Présentation générale	19
B. Classification.....	20
C. Réactivité	24
2.2. Argiles utilisées	24
A. La kaolinite	25
B. La montmorillonite	27
3. LA PHYSIOLOGIE DE L'ABSORPTION INTESTINALE.....	29
3.1. Les structures de l'intestin grêle	29
A. Anatomie.....	29
1) Le duodénum	30
2) Le jéjunum et l'iléon.....	30
B. L'épithélium intestinal	31
1) Structure	32
2) Les cryptes intestinales.....	34
3) Les villosités.....	34
a) Les entérocytes.....	36
b) Le système endomembranaire des entérocytes	38
c) Les microvillosités	38
d) Les autres types cellulaires	40
4) Les organes lymphoïdes	41
C. La flore bactérienne.....	41
3.2. Les fonctions	42
A. La digestion.....	42
1) Absorption de l'eau et des électrolytes	43
2) Absorption des glucides.....	43
3) Absorption des protéines	43
4) Absorption des lipides	44
a) Lipolyse et absorption des triglycérides.....	44
b) Resynthèse des triglycérides	45
c) Formation des chylomicrons	45
d) Migration des chylomicrons.....	46
4) Absorption d'ions : les exemples du fer et de l'aluminium.....	46
B. Le déplacement du bol alimentaire	46
3.3. La physiologie intestinale lors du jeûne et de la réalimentation	47

A. Le jeûne alimentaire.....	47
B. Modification de la muqueuse lors du jeûne.....	48
C. La réalimentation	49
BUT DE L'ÉTUDE	51
MATÉRIELS ET MÉTHODES	53
4. <i>EXPÉRIMENTATION ANIMALE</i>	55
4.1 Animaux	55
A. Conditions d'hébergement.....	55
B. Méthodes d'euthanasie.....	56
4.2. Argile.....	56
4.3. Procédure de jeûne et de réalimentation.....	57
4.4. Régimes alimentaires des différents groupes expérimentaux	57
5. <i>MÉTHODES ANALYTIQUES</i>	61
5.1. Observations microscopiques	61
A. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	61
B. Microscopie électronique par transmission (MET).....	62
1) Protocole 1 classique	62
2) Autres protocoles (2, 3 et 4).....	63
C. Microscopie photonique (MP)	63
D. Microscopie confocale (MC)	64
E. Mesures morphométriques	64
1) Villosités.....	64
2) Entérocytes et microvillosités.....	65
5.2. Composition corporelle	65
A. Préparation des échantillons (lyophilisation, broyage)	65
B. Dosage des lipides (méthode de Folch).....	66
C. Dosage des cendres totales.....	67
5.3. Mesures des concentrations en aluminium	67
A. Dosage par absorption atomique.....	67
B. Dosage par spectrométrie de masse	68
5.4. Mesure des concentrations plasmatiques de sérotonine et de leptine	68
A. Dosage en sérotonine	69
B. Dosage en leptine	69
5.5. Analyses statistiques.....	69
RÉSULTATS.....	71
6. <i>CONSOMMATIONS – GAIN DE MASSE</i>	73
6.1. Consommations de nourriture et d'argile et prises de masse lors des différents régimes alimentaires 73	73
A. Complémentation à long terme (28 jours)	73
1) Expérience 1a (Rats NF28, Kao7 et Kao28).....	73
2) Expérience 1b (Rats NF28, Kao28 et MMT28).....	74
3) Adaptations aux conditions expérimentales.....	76
B. Complémentation lors du jeûne.....	76
C. Complémentation lors de la réalimentation.....	77
1) Expérience 3a. Rats RéaNf et RéaKao1.....	78
2) Réalimentation 3b. Rats RéaNf(-) et RéaKao2	79
D. Complémentation lors d'une restriction.....	80
1) Animaux témoins (rats NF14 et Kao14).....	80
2) Animaux restreints.....	81
6.2. Composition corporelle	81
7. <i>OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES</i>	83
7.1. Observations en microscopie électronique à balayage	83
A. Complémentation à long terme en kaolinite	84
B. Complémentation à long terme en montmorillonite.....	90
C. Remarque	96
D. Complémentation en kaolinite durant le jeûne.....	98

7.2. Observations en microscopie photonique et microscopie électronique par transmission	102
A. Données histologiques	102
1) Complémentation à long terme	102
a) NF14 et NF28	102
b) Kao7, Kao14 et Kao28	106
c) MMT28	114
2) Complémentation lors du jeûne	116
a) NF+P3	116
b) Kao7+P3 et Kao7+P3Kao	116
3) Complémentation lors de la réalimentation	118
a) RéaNF et RéaNF(-)	118
b) RéaKao	120
4) Complémentation lors de la restriction	124
a) Normalement nourris avec restriction NF14(-)	124
b) Restreints avec complémentation en kaolinite Kao14(-)	126
5) Tableau récapitulatif des observations histologiques	128
B. Mesures morphométriques	129
1) Complémentation à long terme	129
a) Expérience NF28, Kao7 et Kao28	129
b) Expérience NF28, Kao28 et MMT28	130
2) Complémentation durant le jeûne	131
3) Complémentation durant la réalimentation	131
4) Complémentation pendant une restriction	133
8. DOSAGES	137
8.1. Teneurs en aluminium	137
A. Complémentation à long terme	137
B. Complémentation durant la réalimentation	139
8.2. Dosages hormonaux	139
A. Sérotonine	139
B. Leptine	139
DISCUSSION	141
9. DISCUSSION	143
9.1. Auto-complémentations en argile	144
A. Consommation d'argile	144
B. Réduction des apports alimentaires	145
C. Gain de masse corporelle	147
D. Effet bénéfique au niveau intestinal	148
9.2. Particules d'argile au contact du mucus intestinal	149
A. Interactions argiles - mucus	150
B. Libération et absorption d'aluminium	151
9.3. Rôle des argiles dans la physiologie intestinale	156
A. Effets sur la digestibilité	156
B. Effets sur l'absorption lipidique	157
1) Étirements du cytoplasme	159
2) Espaces extracellulaires	160
C. Adaptation de la bordure en brosse à l'absorption lipidique	161
D. Autres effets cellulaires observés après ingestion de kaolinite	166
1) Présence de lipides dans les organites cellulaires	166
a) Stockage des lipides en excès de la cellule	166
b) Autophagie cellulaire due à une absorption massive de lipides	167
2) Inflammation de la muqueuse	170
a) Réaction inflammatoire liée à la présence d'aluminium	170
b) Réaction inflammatoire liée à la nécrose	171
c) Argiles et réaction anti-inflammatoire	173
CONCLUSION – PERSPECTIVES	175
CONCLUSION	177

<i>PERSPECTIVES</i>	181
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183
LISTE DES FIGURES	201
LISTE DES TABLEAUX	203
ANNEXES	205
1. Gain de masse et consommation de croquettes et de kaolinite	207
2. Composition corporelle	209
3. Mesures morphologiques.....	210
4. Teneurs en aluminium	214
5. Teneurs en sérotonine et en leptine	215
Liste des publications et des communications	217
TABLE DES MATIÈRES	219