

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
SIDI BEL ABBES

THESE DE DOCTORAT

DE

CHIMIE

Présentée par: *M^{me} BENSEKRANE Badra*

Spécialité : Chimie

Option : Chimie de l'Environnement

*Evaluation de l'action des plantes médicinales
sur la cristallisation des phosphates : intérêt
pour la phytothérapie*

Soutenue le 14/06/2015 Devant le jury composé de :

Président : *M^r. MOUFFOK Bénéali*, Professeur. Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès

Examineurs :

M^r. DERRICHE Zoubir, Professeur. Université Mohamed Boudiaf (USTO), Oran

M^r. DIDI Mohamed Amine, Professeur. Université Aboubakr Belkaid, Tlemcen.

M^r. BELOUATEK Aissa, Professeur. Université, Mostaganem

M^{me} ABDI Kelthoume, Professeur. Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès

Directrice de thèse : *M^{me} HARRACHE Djamilia*, Professeur. Université Djillali Liabès,

Sidi Bel Abbès



Dédicaces

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux deux personnes qui se sont sacrifiées pour que je grandisse avec un savoir faire et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras, et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, sans lesquels je n'y serai parvenue et qui je ne remercierai jamais assez,

Mes très chers parents.

Je dédie aussi cette réalisation

À ma famille

À mes sœurs : vous m'avez beaucoup soutenu à travers vos conseils, vos encouragements. Puisse l'affection, la confiance et la solidarité qui nous animent rester inébranlables. Fraternellement !

À mes frères : trouvez à travers ce modeste travail, l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon profond respect.

À mon époux, À mes enfants, que dieu nous aide à atteindre nos objectifs dans la vie.

Et à toutes mes amies et mes collègues.





Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Dieu tout puissant pour la volonté, la santé et le courage qu'il m'a donné pour suivre mes études et de choisir un métier aussi noble.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à ma directrice de thèse M^{me} HARRACHE Djamilâ, Professeur à l'université Djillali Liabes, qui ma honoré en acceptant de diriger ce travail, je lui exprime mes sentiments de reconnaissance les plus sincères pour ses précieux conseils, sa disponibilité et de m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et mon profond respect à Mr MOUFFOK Bénéali, Professeur à l'université Djillali Liabes, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Je tiens à exprimer mon profond respect au Pr DIDI Mohamed Amine, Professeur à l'université Aboubakr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté de juger ce modeste travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Mes remerciements vont également au Pr DERRICHE Zoubir, Professeur à l'université Mohamed Boudiaf (USTO), Oran, d'avoir accepté de faire part à ce jury et d'évaluer ce travail.

J'exprime aussi ma gratitude au Pr BELOUATEK Aissa, Professeur à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

J'exprime mes plus respectueux remerciements à Mme ABDI Kelthoume, Professeur à l'université Djillali Liabes, pour ses conseils, sa gentillesse et aussi pour l'honneur qu'elle me fait de participer à ce jury.

Je tiens à remercier vivement l'équipe du laboratoire de Microscopie électronique à balayage de l'université de Tlemcen pour leur précieuse aide.

En fin, j'exprime mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et qui ont contribué directement ou indirectement pour mener à bien ce modeste travail.

Très cordialement



TABLE DE MATIÈRE

Introduction générale	1
Chapitre I : <i>Etat de connaissances sur la lithogénèse</i>	
Introduction	6
I Définitions	6
II Les constituants lithiasiques	9
III La lithogénèse	11
III.1 Les étapes de la lithogénèse	11
III.1.1 La Sursaturation urinaire	12
III.1.2 La germination cristalline	13
III.1.3 La croissance cristalline	13
III.1.4 L'agrégation des cristaux	14
III.1.5 L'agglomération cristalline	14
III.1.6 La rétention des particules cristallines	14
III.1.7 La croissance du calcul	14
IV Les promoteurs de la lithogénèse	16
V Les inhibiteurs de la lithogénèse	16
V.1 Les inhibiteurs de faibles poids moléculaire	18
V.2 Inhibiteurs macromoléculaires	19
VI L'influence de pH urinaire	20
VI.1 L'effet de l'acidité	20
VI.2 L'effet de l'alcalinité urinaire	20
VII Les Théories de la lithogénèse	21
VII.1 Théorie de la sursaturation cristallisation	22
VII.2 Théorie du déficit en inhibiteurs de cristallisation	22
VII.3 Théorie de la matrice protéique lithogène	23
VII.4 Théorie des inducteurs de cristallisation	23

VII.5 Théorie de la lithogénèse infectieuse	24
VII.7 Théorie du corps étranger	24
VII.6 Théorie des corpuscules papillaires calcifiés	24
Chapitre II : Les phosphates et la lithogénèse	
Introduction	26
I Cristallisation des phosphates de calcium	28
I.1 Cristallisation du phosphate amorphe de calcium carbonaté PACC	28
II.1.2 Cristallisation de carbapatite	32
II.1.3 Cristallisation de la brushite	35
II-1. 4 Cristallisation de la struvite	38
Chapitre III : Description botanique des plantes médicinales recommandées dans la lithiase urinaire phosphatique et phytothérapie	
Introduction	42
I. La phytothérapie	42
II. Les plantes médicinales	45
III. Les composants actifs d'une plante médicinale	46
IV Description botanique des plantes utilisées dans le traitement de la lithiase phosphatique	51
V Etudes antérieures sur le rôle des plantes médicinales dans le traitement des lithiases phosphocalciques	63

Chapitre IV : Etude de la cinétique de cristallisation de la brushite, en absence et en présence d'extraits aqueux de plantes médicinales, par conductimétrie

Introduction	66
I Rappelle théorique sur la conductivité	67
II Modèle conductimétrique de la cristallisation de la Brushite	70
II.1 Méthodologie	70
II.2 Caractérisation des cristaux	73
II.3 Résultats	74
II.3.1 Cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence) par conductimétrie	74
II.3.2 Cristallisation de la brushite en présence des extraits aqueux de plantes par conductimétrie.	80
II.3.2.3.1 Cristallisation des phosphates en présence des extraits aqueux de <i>Phoenix Dactylifera L</i> (noyaux des dattes)	83
II.3.2.3.2 Cristallisation des phosphates en présence des extraits aqueux de <i>Trigonella Foenum</i> (le fenugrec)	91
II.3.2.3.3 Cristallisation des phosphates en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> (queux de cerise)	98
II.3.2.3.4 Cristallisation des phosphates en présence d'extraits de <i>Malus pumila</i> (pelures de pomme).	106
II.3.2.3.5 Cristallisation des phosphates en présence d'extrait des racines de <i>Rubia Tinctorum</i> (la garance)	114

Chapitre IV: Etude de l'effet des plantes médicinales sur la cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium dihydraté « brushite », dans un modèle biologique

IV.1 Méthodologie :	125
IV.2 Résultats	128
IV.2.1 Etude de l'effet des extraits aqueux de <i>Pheonix dactylifera L</i> sur la cristallisation de la brushite	128
IV.2.2 Etude de l'effet des pelures de <i>Malus pumila</i> sur la cristallisation de la brushite	147
IV.2.3 Etude de l'effet des extraits aqueux <i>d'Hordeum-vulgare</i> (l'orge) sur la cristallisation de la brushite	165
IV.2.4 Etude de l'effet des racines de <i>Rubia tinctorum L</i> (la garance) sur la cristallisation de la brushite	181
IV.2.5 Etude de l'effet des extraits aqueux des <i>Cerasus vulgaris</i> (queux de cerise) sur la cristallisation de la brushite	196
IV.2.6 Etude de l'effet des extraits aqueux de <i>Trigonelle foenum graecum</i> (Fenugrec) sur la cristallisation de la brushite	211
Conclusion générale	229
Références bibliographiques	234

Liste des tableaux

Tableau I.1: Constituants minéraux des lithiases urinaires	9
Tableau I.2: Constituants organiques des lithiases urinaires	10
Tableau I.3: Constituants médicamenteux des lithiases urinaires	10
Tableau I.4 : les principaux inhibiteurs urinaires	17
Tableau I.5 : Les principaux inhibiteurs avec leurs effets sur la cristallisation.	19
Tableau I.6 : Domaine usuel de pH favorisant la précipitation des principales espèces cristallines observées dans les urines.	21
Tableau IV.1 Paramètres conductimétriques de la cinétique de la cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante.	75
Tableau IV.3 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence de noyaux des dattes	84
Tableau IV.4 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence de Fenugrec.	92
Tableau IV.5 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence de queues de cerises.	99
Tableau IV.6: Paramètres conductimétriques obtenus en présence de pelures de pommes.	107
Tableau IV.7: Paramètres conductimétriques obtenus en présence des racines de garance.	115
Tableau V.1: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante	128
Tableau V.2: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD ₁ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 0,0625g/L	132
Tableau V.3: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD ₂ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 0,125g/L	134
Tableau V.4: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD ₃ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 0,25g/L	136
Tableau V.5: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD ₄ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 0,5g/L	138
Tableau V.6: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD ₅ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 1g/L	140
Tableau V.7: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD ₆ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 40 g/L	142

Tableau V.8: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en absence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> (échantillon de référence)	147
Tableau V.9: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP ₁ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 0,0625 g/L	150
Tableau V.10: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP ₂ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 0,125 g/L	152
Tableau V.11: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP ₃ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 0,25 g/L	154
Tableau V.12: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP ₅ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 1 g/L	157
Tableau V.13: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP ₆ (en présence de l'extrait de <i>Phoenix dactylifera L</i> , à 40 g/L	160
Tableau V.14: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait d' <i>Hordeum vulgare</i> à 0,0625g/L.	165
Tableau V.15: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait d' <i>Hordeum vulgare</i> à 0,125g/L.	167
Tableau V.16: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait d' <i>Hordeum vulgare</i> à 0,25g/L.	169
Tableau V.17: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de d' <i>Hordeum vulgare</i> à 0,5g/L.	171
Tableau V.18: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait d' <i>Hordeum vulgare</i> à 1g/L.	174
Tableau V.19: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait d' <i>Hordeum vulgare</i> à 40g/L.	177
Tableau V.20: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,0625g/L.	181
Tableau V.21: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,125g/L.	182
Tableau V.22: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,25g/L.	185
Tableau V.23: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,5g/L.	187
Tableau V.24: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de <i>Rubia tinctorum</i> à 1g/L.	189
Tableau V.25: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de <i>Rubia tinctorum</i> à 40g/L.	191
Tableau V.26: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence).	194

Tableau V.27: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à 0,0625g/L.	196
Tableau V.28: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à 0,125g/L.	199
Tableau V.29: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à 0,25g/L.	202
Tableau V.30: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à 0,5g/L.	204
Tableau V.31: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à 1g/L.	207
Tableau V.32: Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence).	211
Tableau V.33: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH ₁ (en présence de l'extrait de <i>Fenugrec</i> , à 0,0625g/L	215
Tableau V.34: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH ₂ (en présence de l'extrait de <i>Fenugrec</i> , à 0,125g/L	217
Tableau V.35: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH ₃ (en présence de l'extrait de <i>Fenugrec</i> , à 0,25g/L	220
Tableau V.36: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH ₄ (en présence de l'extrait de <i>Fenugrec</i> , à 0,5g/L	222
Tableau V.37: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH ₅ (en présence de l'extrait de <i>Fenugrec</i> , à 1g/L	225

Liste des figures

Figure I.1: Schéma de l'appareil urinaire	8
Figure I.2: Facteurs inducteurs de sursaturation urinaire	12
Figure I.3: Les principales phases de la lithogénèse	15
Figure I.4: Les différents promoteurs de substances cristallisables	16
Figure I.5: Cristallisation hétérogène entre brushite et weddelite	23
Figure I.6: Calcul oxalocalcique formé à partir d'une calcification papillaire	24
Figure I.7: Calcul développé autour d'une sonde	25
Figure II.1: Granulations de PACC vue en lumière polarisée	29
Figure II.2: Plaque vitreuse de PACC	29
Figure II.3: Granulations de PACC, sous forme de cylindre	30
Figure II.4: Spectre IRTF de référence de PACC	31
Figure II.5: Carapatite (aspect de granulations) et cristaux de struvite (cristaux rectangulaires)	33
Figure II.6: Spectre IRTF de référence de la carapatite	33
Figure II.7: Calculs de carapatite.	34
Figure II.8: Calculs de carapatite associée à la struvite (carapatite majoritaire).	34
Figure II.9 : Calcul de carapatite associé au weddellite	35
Figure II.10: Cristaux et agrégats de brushite en différentes formes vus en lumière polarisée.	36
Figure II.12: Spectre IRTF de référence de la brushite	37
Figure II.13: Différents calculs de brushite.	38
Figure II.14: Cristaux de struvite vue en microscopie optique.	39
Figure II.15: Spectre IRTF de référence de la struvite	40
Figure II.16: Calcul de struvite	40
Figure II.17: Calcul majoritaire en struvite + la carapatite	41
Figure III.1: Phoenix dactylifera L (les dattes)	51
Figure III.2: Trigonella foenum (fenugrec)	53
Figure III.3: Cerasus vulgaris (cerise)	55
Figure III.4: Malus pumila (la pomme)	58
Figure III.5: Rubia tinctorum (la garance)	60

Figure III.6: Hordeum vulgare (l'orge)	62
Figure IV.1: Photo illustrant le montage expérimental utilisé pour le suivi de la cristallisation de la brushite en milieu aqueux.	72
Figure IV.2: Courbe conductimétrique de la cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence)	74
Figure IV.3 : Evolution de la croissance des cristaux de brushite	75
Figure IV.4: Micrographies MEB de l'échantillon obtenu en absence d'extrait de plante (échantillon de référence) (agrandissement 800 fois)	76
Figure IV.5: Spectre IR de l'échantillon de référence (sans inhibiteur)	77
Figure IV.6: Spectre IR de la brushite (de référence)	78
Figure IV.7: Diagramme DRX de l'échantillon de référence (sans inhibiteur)	79
Figure IV.8: Aspect des plantes utilisées	81
Figure IV.9: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L.</i>	84
Figure IV.10: Spectre IR de l'échantillon D ₁ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à la concentration 0,0625g/L)	85
Figure IV.11: Spectre IR de l'échantillon D ₂ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à la concentration C ₂ = 0,125g/L)	86
Figure IV.12: Spectre IR de l'échantillon D ₃ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à la concentration C ₃ = 0,25g/L)	87
Figure IV.13: Spectre IR de l'échantillon D ₄ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à la concentration C ₄ = 0,5g/L)	88
Figure IV.14: Spectre IR de l'échantillon D ₅ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à la concentration C ₅ =1g/L)	89
Figure IV.15: Spectre DRX de l'échantillon D ₁ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à la concentration C ₁ = 0,0625g/L)	90
Figure IV.16: Spectre DRX de l'échantillon D ₅ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à la concentration C ₅ = 1g/L)	90
Figure IV.17: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits de <i>Trigonella foenum.</i>	91
Figure IV.18: Spectre IR de l'échantillon H ₁ (en présence d'extrait de <i>Trigonella foenum</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	93
Figure IV.19: Spectre IR de l'échantillon H ₂ (en présence d'extrait de <i>Trigonella foenum</i> à la concentration C ₂ =0,125g/L).	93
Figure IV.20: Spectre IR de l'échantillon H ₃ (en présence d'extrait de <i>Trigonella foenum</i> à la concentration C ₃ =0,25g/L).	94
Figure IV.21: Spectre IR de l'échantillon H ₄ (en présence d'extrait de <i>Trigonella foenum</i> à la concentration C ₄ =0,5g/L).	94

Figure IV.22: Spectre IR de l'échantillon H ₅ (en présence d'extrait de <i>Trigonella foenum</i> à la concentration C ₅ =1g/L).	96
Figure IV.23: Spectre DRX de l'échantillon H ₁ (en présence d'extrait de <i>Trigonella foenum</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	97
Figure IV.24: Spectre DRX de l'échantillon H ₅ (en présence d'extrait de <i>Trigonella foenum</i> à la concentration C ₅ =1g/L).	97
Figure IV.25: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits des queues de <i>Cerasus vulgaris</i> .	98
Figure IV.26: Spectre IR de l'échantillon Q ₁ (en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	100
Figure IV.27: Spectre IR de l'échantillon Q ₂ (en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à la concentration C ₂ =0,125g/L).	101
Figure IV.28: Spectre IR de l'échantillon Q ₃ (en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à la concentration C ₃ =0,125g/L).	102
Figure IV.29: Spectre IR de l'échantillon Q ₄ (en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à la concentration C ₄ =0,5g/L).	103
Figure IV.30: Spectre IR de l'échantillon Q ₅ (en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à la concentration C ₅ =1g/L).	104
Figure IV.31: Spectre DRX de l'échantillon Q ₁ (en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	105
Figure IV.32: Spectre DRX de l'échantillon Q ₅ (en présence d'extrait de <i>Cerasus vulgaris</i> à la concentration C ₅ =1g/L).	105
Figure IV.33: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits des <i>Malus pumila</i>	106
Figure IV.34: Spectre IR de l'échantillon P ₁ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	108
Figure IV.35: Spectre IR de l'échantillon P ₂ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à la concentration C ₂ =0,125g/L).	109
Figure IV.36: Spectre IR de l'échantillon P ₃ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à la concentration C ₃ =0,25g/L).	110
Figure IV.37: Spectre IR de l'échantillon P ₄ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à la concentration C ₄ =0,5g/L).	111
Figure IV.38: Spectre IR de l'échantillon P ₅ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à la concentration C ₅ =1g/L).	112
Figure IV.39: Spectre DRX de l'échantillon P ₁ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	113
Figure IV.40: Spectre DRX de l'échantillon P ₅ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à la concentration C ₅ =1g/L).	113

Figure IV.41: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits de <i>Rubia tinctorum</i> .	114
Figure IV.42: Spectre IR de l'échantillon F ₁ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	116
Figure IV.43: Spectre IR de l'échantillon F ₂ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à la concentration C ₂ =0,125g/L).	117
Figure IV.44: Spectre IR de l'échantillon F ₃ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à la concentration C ₃ =0,25g/L).	118
Figure IV.45: Spectre IR de l'échantillon F ₄ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à la concentration C ₄ =0,5g/L).	119
Figure IV.46: Spectre IR de l'échantillon F ₅ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à la concentration C ₅ =1g/L).	120
Figure IV.47: Spectre DRX de l'échantillon F ₁ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à la concentration C ₁ =0,0625g/L).	121
Figure IV.48: Spectre DRX de l'échantillon F ₅ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à la concentration	122
Figure IV.49: Pourcentage d'inhibition de l'extrait aqueux des plantes : Datte, Cerise, Fenugrec, Pomme et Garance, en fonction de leur concentration respective dans l'intervalle (1 à 0.0625 g/L).	123
Figure V.1: Micrographie MEB (65x) de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) (vue globale)	129
Figure V.2: Micrographie MEB de l'échantillon de référence (sans inhibiteur) à différents agrandissements	130
Figure V.3: Micrographie MEB (2500x) de la surface d'une granulation sphérique d'apatite	131
Figure V.4: Micrographie MEB (80x) de l'échantillon UD ₁ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à 0.0625g/L) (vue globale)	133
Figure V.5: Micrographie MEB de l'échantillon UD ₁ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 0,0625 g/L), à différents agrandissements.	134
Figure V.6: Micrographie MEB (80x) de l'échantillon UD ₂ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 0,125 g/L) (vue globale)	135
Figure V.7: Micrographie MEB de l'échantillon UD ₂ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 0,125 g/L), à différents agrandissements.	135
Figure V.8: Micrographie MEB (66x) de l'échantillon UD ₃ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 0,25 g/L) (vue globale)	136
Figure V.9: Micrographie MEB de l'échantillon UD ₃ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera L</i> à 0,25 g/L), prises à différents agrandissements	137

Figure V.10: Micrographie MEB (121x) de l'échantillon UD ₄ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 0,5 g/L) (vue globale)	138
Figure V.11: Micrographie MEB de l'échantillon UD ₄ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 0,5 g/L), à différents agrandissements.	139
Figure V.12: Micrographie MEB (50x) l'échantillon UD ₅ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 1 g/L) (vue globale)	140
Figure V.13: Micrographie MEB de l'échantillon UD ₅ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 1 g/L à différents agrandissements.	141
Figure V.14: Micrographie MEB (50x) de l'échantillon UD ₆ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 40 g/L) (vue globale)	142
Figure V.15: Micrographie MEB de l'échantillon UD ₆ (en présence d'extrait de noyaux de <i>Phoenix dactylifera</i> à 40 g/L à différents agrandissements.	143
Figure V.16: Spectre IR des granulations d'apatite	144
Figure V.17: Micrographie MEB (120x) de l'échantillon de référence (sans inhibiteur) (vue globale)	147
Figure V.18: Micrographie MEB de l'échantillon de référence, à différents agrandissement.	148
Figure V.19: Spectre IR de l'échantillon de référence (en absence d'inhibiteur)	149
Figure V.20: Micrographie MEB (65x) de l'échantillon UP ₁ (en présence d'extrait <i>Malus pumila</i> à 0,0625 g/L (vue globale)	150
Figure V.21: Micrographies MEB de l'échantillon UP ₁ (en présence de l'extrait de <i>Malus pumila</i> à 0,0625g/L).	151
Figure V.22: Spectre IR de l'échantillon UP ₁	152
Figure V.23: Micrographie MEB (65x) de l'échantillon UP ₂ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à 0,125 g/L) (vue globale)	153
Figure V.24: Micrographies MEB de l'échantillon UP ₂ (en présence de l'extrait de <i>Malus pumila</i> à 0,125g/L).	153
Figure V.25: Spectre IR de l'échantillon UP ₂	157
Figure V.26: Micrographie MEB (64x) de l'échantillon UP ₃ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à 0,25 g/L) (vue globale)	155
Figure V.27: Micrographie MEB de l'échantillon UP ₃ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à 0,25g/L), à différents agrandissements.	156
Figure V.28 : Spectre IR de l'échantillon UP ₃	157
Figure V.29: Micrographie MEB (200x) de l'échantillon UP ₅ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à 1g/L) (vue globale)	158
Figure V.30: Micrographie MEB de l'échantillon UP ₅ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à 1g/L), à différents agrandissements.	159
Figure V.31 : Spectre IR de l'échantillon UP ₅	160

Figure V.32: Micrographie MEB (100x) de l'échantillon UP ₆ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à 40 g/L) (vue globale)	161
Figure V.33: Micrographie MEB de l'échantillon UP ₆ (en présence d'extrait de <i>Malus pumila</i> à 40g/L), à différents agrandissements.	162
Figure V.34: Spectre IR de l'échantillon UP ₆	162
Figure V.35: Micrographie MEB (50x) de l'échantillon UO ₁ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 0,0625g/L) (vue globale)	166
Figure V.36: Micrographie MEB de l'échantillon UO ₁ (en présence d'extrait d'orge à 0,0625g/L), à différents agrandissements.	166
Figure V.37: Spectre IR de l'échantillon UO ₁	167
Figure V.38: Micrographie MEB (49x) de l'échantillon UO ₂ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 0,125g/L) (vue globale)	168
Figure V.39: Micrographie MEB de l'échantillon UO ₂ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 0,125g/L), à différents agrandissements.	168
Figure V.40: Micrographie MEB (50x) de l'échantillon UO ₃ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 0,25g/L) (vue globale)	169
Figure V.41: Micrographie MEB de l'échantillon UO ₃ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 0,25g/L), à différents agrandissements.	170
Figure V.42: Micrographie MEB (79x) de l'échantillon UO ₄ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 0,5g/L) (vue globale)	171
Figure V.43: Micrographie MEB de l'échantillon UO ₄ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 0,5g/L), à différents agrandissements.	172
Figure V.44: Spectre IR de l'échantillon UO ₄	173
Figure V.45: Micrographie MEB (51x) de l'échantillon UO ₅ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à la concentration 1g/L) (vue globale)	174
Figure V.46: Micrographie MEB de l'échantillon UO ₅ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 1g/L), à différents agrandissement.	175
Figure V.47: Micrographie MEB de l'échantillon UO ₅ (2000 fois)	176
Figure V.48: Micrographie MEB (80x) de l'échantillon UO ₆ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 40 g/L) (vue globale)	177
Figure V.49: Micrographie MEB de l'échantillon UO ₆ (en présence d'extrait d' <i>Hordeum-vulgare</i> à 40g/L), à différents agrandissement.	178
Figure V.50: Micrographie MEB (2500x) de l'échantillon UF ₁ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,0625g/L)	181
Figure V.51: Micrographie MEB (149x) de l'échantillon UF ₂ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,125g/L)	183
Figure V.52: Micrographie MEB de l'échantillon UF ₂ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,125g/L) à différents agrandissements.	183

Figure V.53: Spectre IR de l'échantillon UF ₂	184
Figure V.54: Micrographie MEB (250×) de l'échantillon UF ₃ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,25g/L) (vue globale)	185
Figure V.55: Micrographie MEB de l'échantillon UF ₃ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,25g/L) à différents agrandissements.	186
Figure V.56: Spectre IR de l'échantillon UF ₃	186
Figure V.57: Micrographie MEB (500×) de l'échantillon UF ₄ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,5g/L) (vue globale)	188
Figure V.58: Micrographie MEB de l'échantillon UF ₄ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 0,5g/L) à différents agrandissements.	188
Figure V.59: Micrographie MEB (81×) de l'échantillon UF ₅ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 1 g/L) (vue globale)	189
Figure V.60: Micrographie MEB de l'échantillon UF ₅ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 1 g/L) à différents agrandissements.	190
Figure V.61: Micrographie MEB (250×) de l'échantillon UF ₆ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 40 g/L) (vue globale)	191
Figure V.62: Micrographie MEB (800×) de l'échantillon UF ₆ (en présence d'extrait des racines de <i>Rubia tinctorum</i> à 40 g/L) (vue globale)	192
Figure V.63: Micrographie MEB (152x) de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) (vue globale)	194
Figure V.64: Micrographie MEB de l'échantillon de référence (sans inhibiteur) à différents agrandissements.	195
Figure V.65: Spectre IR de l'échantillon de référence	196
Figure V.66: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₁ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 0,0625g/L) à différents agrandissements.	197
Figure V.67: Spectre IR de l'échantillon UQ ₁	198
Figure V.68: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₂ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 0,125g/L) à différents agrandissements.	200
Figure V.69: Spectre IR de l'échantillon UQ ₂	201
Figure V.70: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₃ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 0,25g/L) (vue globale).	202
Figure V.71: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₃ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 0,25g/L) à l'agrandissement 3000 fois.	203
Figure V.72: Spectre IR de l'échantillon UQ ₃	204
Figure V.73: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₄ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 0,5g/L) à l'agrandissement 1200fois.	205
Figure V.74: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₃₄ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 0,5g/L) à différents agrandissement.	205

Figure V.75: Spectre IR de l'échantillon UQ ₄	206
Figure V.76: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₅ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 1g/L) à l'agrandissement 1200fois.	207
Figure V.77: Micrographie MEB de l'échantillon UQ ₅ (en présence d'extrait de <i>cerasus vulgaris</i> à 1g/L) à différents agrandissements.	208
Figure V.78: Spectre IR de l'échantillon UQ ₅	209
Figure V.79: Micrographie MEB (250x) de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) (vue globale)	211
Figure V.80: Micrographie MEB de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) à l'agrandissement 800 fois.	212
Figure V.81: Spectre IR de l'échantillon de référence	214
Figure V.82: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₁ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,0625 g/L) à l'agrandissement 800 fois.	216
Figure V.83: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₁ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,0625 g/L) à l'agrandissement 1000 fois.	216
Figure V.84: Spectre IR de l'échantillon UH ₁	217
Figure V.85: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₂ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,125 g/L) à l'agrandissement 1000 fois.	218
Figure V.86: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₂ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,125 g/L) à l'agrandissement 2000 fois.	219
Figure V.87: Spectre IR de l'échantillon UH ₂	219
Figure V.88: Micrographie MEB (300×) de l'échantillon UH ₃ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,25 g/L) (vue globale).	220
Figure V.89: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₃ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,25 g/L) à différents agrandissement.	221
Figure V.90: Spectre IR de l'échantillon UH ₃	198
Figure V.91: Micrographie MEB (500×) de l'échantillon UH ₄ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,5 g/L) (vue globale).	223
Figure V.92: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₄ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,5 g/L) à différents agrandissement.	224
Figure V.93: Spectre IR de l'échantillon UH ₄	225
Figure V.94: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₅ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 1 g/L) à l'agrandissement 1500 fois.	226
Figure V.95: Micrographie MEB de l'échantillon UH ₅ (en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 1 g/L) à l'agrandissement 4000 fois.	227

Evaluation de l'action des plantes médicinales sur la cristallisation des phosphates : intérêt pour la phytothérapie

Résumé : Les phosphates calciques comptent plusieurs formes et sont des espèces lithogènes, dont la fréquence est élevée dans les calculs urinaires et dans les urines des sujets lithiasiques. Dans le cas de la lithiase urinaire, les médicaments conventionnels peuvent avoir un effet limité et les sujets préfèrent des cures à base de plantes médicinales, qui semblent être plus naturelles et pas coûteuses. La pharmacopée traditionnelle algérienne est riche et diversifiée et le recours au traitement traditionnel, se fait souvent d'emblée et en automédication, sans se préoccuper du type de lithiase. La présente étude se propose de déterminer l'effet des extraits aqueux de plusieurs plantes médicinales aux concentrations (0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1,0 et 40g/L), sur la cristallisation de certains phosphates calciques observés dans les calculs et les urines de sujets lithiasiques, telle que la brushite (hydrogénophosphate de calcium dihydraté) et la carapatite (phosphate de calcium carbonaté), dans deux modèles expérimentaux : modèle conductimétrique (urine artificielle) et modèle biologique (urine totale). La morphologie, la taille, l'agrégation et l'abondance des cristaux de phosphates formés dans les deux modèles, en absence et en présence des différents extraits testés, ont été observées par MEB et par DRX. La distinction de différentes apatites formées, a nécessité une analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF). Issus des résultats et observations, il apparaît que, globalement, certaines plantes possèdent des propriétés en faveur de corroborer le savoir traditionnel et pourrait être très intéressante dans la prévention des lithiases de brushite, alors d'autres favorisent la cristallisation de certaines apatites.

Mots clés : phosphates – lithiase urinaire – plantes médicinales - brushite – apatite – urine artificielle – urine totale – cristallisation – caractérisation.

Abstract: Calcium phosphates have many forms and are lithogenic species whose frequency is higher in urinary stones and urine of stone formers subjects. In the case of urolithiasis, conventional medicines may have a limited effect and the subjects prefer based herbal cures that seem to be more natural and not expensive. The Algerian traditional medicine is rich and diverse and the use of traditional treatment, is often readily and self-medication, regardless of the type of stones. The present study aims to determine the effect of aqueous extracts of several medicinal plants concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and 40 g /L), on the crystallization of certain calcium phosphates observed in calculations and urine lithiasic topics as brushite (dicalcium phosphate dihydrate) and carapatite (carbonated calcium phosphate) in two experimental models: conductivity model (artificial urine) and biological model (total urine). The morphology, size, aggregation and abundance of phosphate crystals formed in the two models, in the absence and presence of various extracts tested, were observed by SEM and XRD. The distinction of different apatite formed, required analysis by infrared spectroscopy (FTIR). From the results and observations, it appears that, overall, some plants have properties for corroborate traditional knowledge and could be very interesting in the prevention of brushite stones, while others favor the crystallization of some apatites.

Keywords: phosphates - urolithiasis - medicinal plants - brushite - apatite - artificial urine - Total urine - crystallization - characterization.

المخلص

لفسفات الكالسيوم أنواع مختلفة, تتواجد بنسبة عالية في البول و في الحصى البولية. في حالة الحصى البولية , للأدوية الطبية المرخصة تأثير محدود لذلك يفضل المرضى التداوي بالأعشاب الطبية لأنها طبيعية و غير مكلفة . الأدوية التقليدية الجزائرية كثيرة و متنوعة و التداوي بها يتم في غالب الأحيان بالتطبيب الذاتي دون مراعاة نوع الحصى .

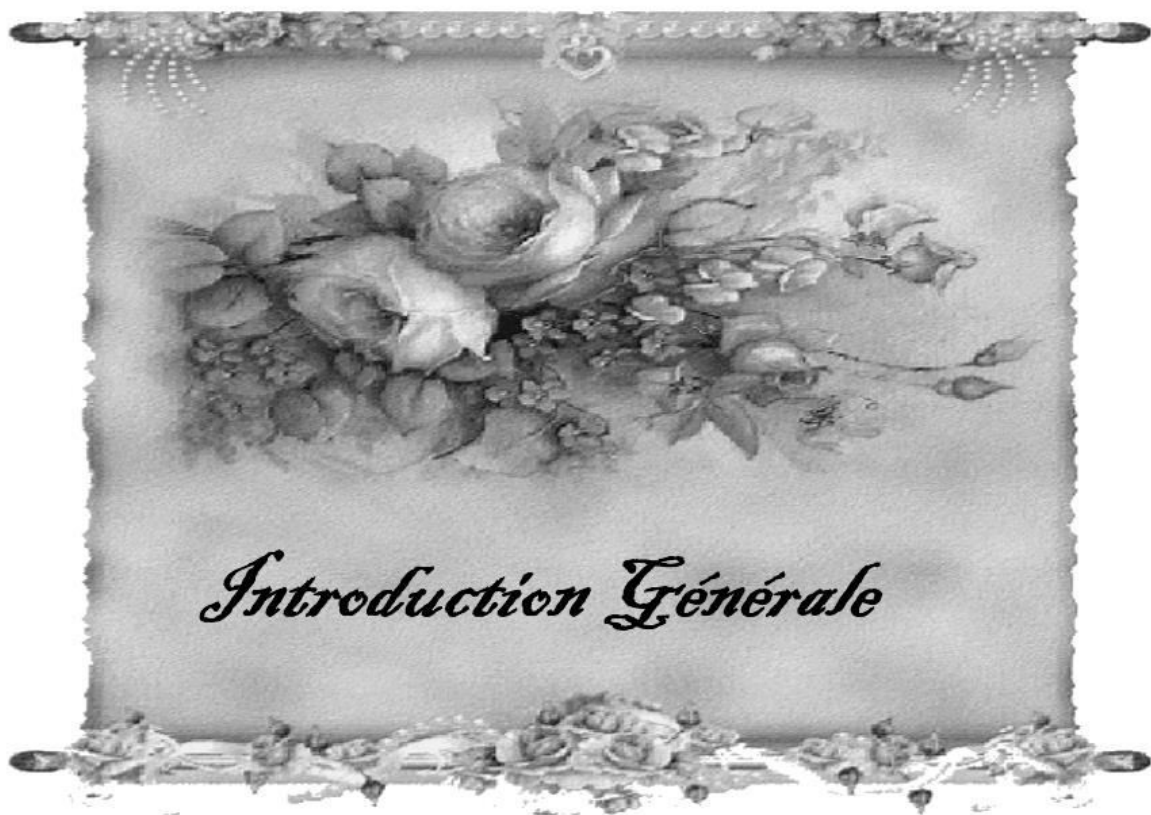
تهدف هذه الدراسة إلى تحديد تأثير المستخلصات المائية لعدة نباتات طبية بتركيزات مختلفة (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 40) غ/ل على بلورة بعض أشكال فوسفات الكالسيوم المتواجدة في الحصى و في بول المرضى من خلال نموذجين : نموذج قياس الناقلية (البول الاصطناعي) و نموذج بيولوجي (البول الطبيعي). تم تحديد مورفولوجيا و حجم و تجمع و كذا وفرة البلورات الفوسفاتية المشكلية في النموذجين بوجود و غياب مختلف المستخلصات المجربة بمجهر المسح الإلكتروني و الأشعة السينية. تمييز مختلف الأباتيت تطلب تحليل بواسطة مطياف الأشعة تحت الحمراء. من النتائج و الملاحظات يبدو عموما أن بعض النباتات لها خواص تؤكد المعارف التقليدية و قد تكون مفيدة في الوقاية من حصى في حين البعض الآخر يحفز بلورة الأباتيت.

الكلمات المفتاحية: الفوسفات -حصى بولي -النباتات الطبية - brushite -الأباتيت -البول الاصطناعي -إجمالي البول -تلور -التوصيف

Présenté par M^{me} Bensekrane Badra

Département de chimie, Faculté des sciences, BP 89, Rue Larbi Ben Mhidi, SBA 22000

bensekranebadra@yahoo.fr



Introduction Générale

Introduction générale

A travers des siècles, l'homme a utilisé les plantes médicinales pour se soigner, en entretenant d'étroits rapports avec le monde végétal. Malgré la biodiversité d'espèces végétales, les tradipraticiens et les herboristes ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales en sélectionnant des plantes actives avec une similitude de l'usage et des indications chez des populations qui n'ont eu aucun échange culturel. Cet engouement pour les plantes médicinales, peut s'expliquer par le coût élevé des médicaments conventionnels et/ou de la prise en charge de la lithotritie extracorporelle (LEC) et l'urétéroscopie (URS), le faible pouvoir d'achat en particulier chez les populations dans les pays en développement, ainsi que l'échec relatif à la médecine moderne devant certaines maladies, la méfiance vis-à-vis des produits de synthèse et de leur toxicité, les effets secondaires de l'ingestion des médicaments conventionnels, l'envie de consommer Bio et les croyances ethniques (Larrey D, 1997 ; Schuppan et al., 1999; Stedman, 2002; Pageaux et Larrey D, 2003; Peyren Biroulet et al., 2004).

Dans les pays industrialisés, l'intérêt des populations pour les thérapies naturelles a considérablement augmenté, malgré les progrès stupéfiants accomplis au cours des dernières années dans le domaine de la médecine conventionnelle, mais dont le coût devient de plus en plus exorbitant. Ces thérapies simples se basent sur l'utilisation des plantes médicinales et des médicaments à base de plantes.

Divers facteurs favorisent la popularité des plantes médicinales dans ces pays, en particulier le mouvement écologique qui se développe depuis plusieurs années, l'idée que ce qui est naturel est Bio et ne peut être que bénéfique. Les plantes médicinales sont utilisées aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. En effet, 25 % des médicaments modernes sont préparés à base de plantes qui ont au départ été utilisées traditionnellement (OMS, 2003).

La phytothérapie suscite actuellement un renouveau d'intérêt s'appuyant sur des traditions millénaires de la médecine traditionnelle (**Larrey D, 1997 ; Schuppan et al, 1999; Stedman, 2002; Pageaux et Larrey D, 2003; Peyren Biroulet et al, 2004**). Toutefois, les potentialités thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales restent à découvrir et doivent être justifiées par des preuves scientifiques indiscutables.

En effet, le recours aux plantes médicinales est encore mal documenté et repose pour l'essentiel sur les recommandations des herboristes ou sur les vertus thérapeutiques et les connaissances empiriques issues de l'usage traditionnel au sein de la population ou encore sur les croyances propres à la culture ethnique inhérente à chaque région.

C'est certainement l'absence d'appui scientifique qui rend l'usage des plantes médicinales souvent contesté, leur efficacité souvent remise en question dans les sociétés industrialisées. Pourtant, des milliers de plantes médicinales recensées à ce jour sont utilisées par 80% de la population mondiale pour lutter contre diverses maladies (**Hamilton, 2003**). L'Organisation mondiale de la santé a soutenu l'établissement d'une base pour la conservation des plantes médicinales et a encouragé les pays en voie de développement à organiser la médecine traditionnelle dans des cadres réglementaires et cela depuis la célèbre déclaration d'Alma Alta de 1978 qui a permis de faire une place aux remèdes traditionnels.

En Algérie, la médecine douce est encore largement sollicitée chez la population qui semble être plus sensible aux traditions ethniques pour plusieurs raisons qui se trouvent être les mêmes dans d'autres pays (**Laquarta,1999 ; Vann,1998 ; Lartigau-Roussin,2002**), où dont l'intérêt est celui de représenter le seul arsenal thérapeutique à disposition des malades pour lesquels les traitements médicaux posent le problème de leur coût exorbitant ou de leur non disponibilité.

La pharmacopée traditionnelle algérienne est riche et diversifiée à l'image de la diversification de la flore algérienne et le traitement par les plantes fait partie de notre patrimoine culturel et se transmet de génération en génération. Cependant, le recours au traitement traditionnel, dans notre pays, se fait souvent d'emblée, en automédication, sous forme de cures à base de tisanes de plantes médicinales. Toutefois, certains patients soucieux de leur santé ont recours aux deux médecines (conventionnelle et traditionnelle).

Dans le cas de la lithiase urinaire, maladie caractérisée par la formation d'un calcul (pierre) dans les reins ou dans les voies urinaires, certains médicaments conventionnels peuvent avoir un effet limité, ce qui favorise le recours au traitement traditionnel. Les plantes recensées et recommandées dans le traitement de la lithiase urinaire sont nombreuses, mais leur action par rapport au type de calcul n'est pas spécifiée. Or la lithiase compte une diversité de constituants lithogènes, donc une diversité de types morphologiques connus et dont la prévention ou la dissolution en dépend. L'effet curatif d'une plante dépend de la nature du calcul.

L'action d'une plante sur la cristallisation d'une espèce lithogène peut avoir lieu sur une ou plusieurs étapes de la lithogénèse qui comprend : la sursaturation urinaire, la nucléation cristalline, la croissance des cristaux, leur agrégation et enfin sur la croissance du calcul. Cette action peut être inhibitrice ou inductrice.

A titre d'exemple, le phosphate de calcium, 2^{ème} espèce lithogène après l'oxalate de calcium par sa fréquence dans les calculs, a été observé dans 85% des calculs en Algérie (**Harrache et al, 1997**), 70% au Maroc (**Oussama et al, 2000**) et 16.3% en France (**Daudon et al, 1995**). Les phosphates sont présents au minimum, sous cinq principales formes minérales dans les urines : la carapatite, la struvite, la whitlockite, la brushite et le PACC (phosphate amorphe de calcium carbonaté) (**Doré, 2004 ; Daudon et al, 2004**).

Les propriétés de dissolution de ces phosphates de calcium dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques. Chaque phosphate de calcium a son propre produit de solubilité qui est dépendant de sa concentration molaire, du pH et plus précisément de la concentration en calcium ionisé, de la concentration en ion PO_4^{-3} et/ ou HPO_4^{-2} (**Pak, 1969 ; Boistelle et Berland, 1992 ; Sujata et al, 2010, Ferreira et al, 2003**). L'existence de différentes phases cristallines, dépendamment des conditions du milieu, rend l'étude des phénomènes de précipitation des phosphates de calcium particulièrement difficile.

Les mécanismes d'action des plantes dans le traitement de la lithiase phosphatique n'ont pas été démontrés clairement.

Dans ce contexte, la cristallisation in vitro des phosphates lithogènes sera suivie, dépendamment des conditions du milieu (notamment du pH), en absence et en

présence de plantes médicinales, dans un intervalle de concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 40) g/L, dans deux modèles expérimentaux : modèle conductimétrique (urine artificielle) et le modèle biologique (urine totale), dans les conditions d'un milieu sursaturé en phosphates de calcium tel que l'hydrogénophosphate de calcium (Brushite). Les plantes médicinales choisies sont : *Hordeum vulgare*, *Trigonella foenum-graecum*, *Prunus cerasus*, *Malus pumila*, *Rubia tinctorum* et *Phoenix dactylifera*.

Différentes méthodes physiques d'analyse seront utilisées afin de caractériser les espèces lithogènes formées : la Microscopie Electronique à Balayage (MEB), la diffraction aux rayons X et l'infra rouge (IRTF).

La présente étude revêt un grand intérêt pour le traitement prophylactique de la lithiase urinaire phosphocalcique et permet de valider ou non le savoir traditionnel en phytothérapie. .

La présente thèse sera articulée comme suit :

Chapitre I : Nous aborderons dans le premier chapitre, les différentes définitions et notions relatives à la lithiase urinaire. Cet état de connaissances qui porte principalement sur la lithogénèse, sera un support utile pour la compréhension de la suite du manuscrit.

Chapitre II : Nous présenterons une description de la cristallisation dans le milieu urinaire des différents phosphates, leur aspect dans l'urine, le type de calcul qu'ils génèrent, leur caractérisation par Infra Rouge (IRTF). Ces notions sont fondamentales et représentent l'outil que nous avons utilisé afin de suivre la cristallisation et l'identification de certains phosphates calciques et afin d'évaluer l'effet des extraits de plantes médicinales sur leur cristallisation.

Chapitre III : Un état de connaissance sur la phytothérapie et les plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase urinaire, sera présenté en premier lieu. Un portrait exhaustif des plantes médicinales utilisées en Algérie pour le traitement de ce type de pathologie, sera dressé. Nous présenterons aussi les travaux antérieurs sur l'action des plantes dans le traitement de la lithiase phosphatique, en particulier phosphocalcique.

Chapitre IV : Comme première partie expérimentale, nous tenterons de démontrer l'effet *in vitro* de l'apport d'extraits aqueux préparés à partir de différentes plantes médicinales les plus utilisées et les plus recommandées par les herboristes et les plus indiquées dans la pharmacopée algérienne, dans le traitement de la lithiase urinaire.

Pour ce faire, nous choisirons de suivre la cinétique de cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium (brushite) en solution aqueuse sursaturée, à 37°C, dans un modèle conductimétrique en continu, en absence et en présence des extraits aqueux de plantes médicinales à différentes concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1) g/L.


Les plantes testées sont : *Phoenix dactylifera L.*, *Trigonella foenum*, *Malus pumila*, *Rubia tinctorum* et *Cerasus vulgaris*.

L'effet de l'apport des plantes médicinales sur le risque lithogène phosphocalcique, reposera sur la comparaison des paramètres conductimétriques et sur la détermination du % d'inhibition.

Chapitre V : Dans une deuxième approche expérimentale, utilisant un modèle biologique, nous nous proposerons de déterminer l'effet des plantes : *Phoenix dactylifera L.*, *Trigonella foenum*, *Malus pumila*, *Rubia tinctorum*, *Cerasus vulgaris* et *Hordum vulgare*, sur la cristallisation de la brushite induite dans l'urine d'un sujet sain, sans antécédents lithiasiques.

La caractérisation des cristaux obtenus en fin de cristallisation, dans les deux modèles, sera faite par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et diffraction des Rayons X. La distinction de différentes apatites formées, a été réalisée par spectroscopie infrarouge (IRTF). L'effet de l'apport des plantes médicinales sur le risque lithogène, reposera sur la comparaison entre la nature et les faciès des espèces présentes, leur taille et leur abondance, en présence de plantes médicinales par rapport à l'échantillon de référence (en absence de plantes).

Enfin, pour conclure, les résultats seront discutés et les conclusions orientées dans le sens de corroborer ou non le savoir traditionnel et aussi afin de sélectionner les plantes les plus actives, dont l'usage sera bénéfique en phytothérapie.



Chapitre I :
Etat de connaissances
sur la lithogénèse

Introduction

La lithiase urinaire est une maladie aussi vieille que l'humanité et qui constitue un problème majeur de santé publique pour de nombreux pays, du fait de sa fréquence, de ces complications et du coût très élevé pour son traitement. C'est une pathologie plurifactorielle complexe dont la survenue relève de plusieurs causes : les anomalies anatomiques, les causes métaboliques, les facteurs nutritionnels, les infections urinaires, la prise de certains médicaments et l'exposition professionnelle (**Daudon, 2005**). Les conditions de vie et de nutrition influencent directement l'incidence de la lithiase urinaire. En effet, cette pathologie a évolué avec l'industrialisation et la modification des habitudes alimentaires (**Daudon et Jungers, 2001 ; Junger et al, 1989**). Des progrès stupéfiants ont été accomplis au cours des dernières années dans le domaine de la médecine conventionnelle telle que la lithotritie extracorporelle (LEC) et l'urétéroscopie (URS) mais dont le coût devient de plus en plus exorbitant.

Parmi les moyens thérapeutiques préventifs, on trouve le recours aux inhibiteurs de cristallisation (**Hennequin et al, 1993 ; Abdelmalek et al, 2001 ; Amar et al, 2006**)

Depuis Ambroise Paré jusqu'à nos jours, le traitement préventif et prophylactique de la lithiase urinaire n'a cessé de progresser à travers l'histoire.

Dans ce premier chapitre, nous aborderons les différentes définitions et notions relatives à la lithiase urinaire. Cet état de connaissances qui porte principalement sur la lithogénèse sera un support utile pour les chapitres ultérieurs.

I Définitions

1.1 La lithiase urinaire

La lithiase urinaire ou « maladie de pierre » est l'une des plus anciennes maladies humaines (**Tuma et Hess, 2001**). Elle consiste en la formation et/ou la présence de calculs dans les reins ou les voies urinaires (cavités rénales, uretères, vessie). La maladie lithiasique, du grec « lithos » qui signifie pierre, se confond avec l'histoire de l'humanité puisque le premier calcul vésical connu remonte aux environs de 4800 ans avant Jésus-Christ, et a été découvert dans les restes d'une momie en haute Egypte (**Daudon, 2005**).

La lithiase urinaire est définie comme le résultat d'une précipitation anormale des constituants normaux de l'urine à l'intérieure du tractus urinaire (**Daudon et al, 2012**).

La fréquence de cette maladie ne cesse d'augmenter et affecte environ 10% de la population des pays industrialisés, et de 4 à 20% de la population générale, selon les pays (**Brandi et al, 2008**). Cette augmentation est liée à la profonde modification des habitudes alimentaires (**Jungers, 1989; Daudon et Jungers, 2001**). En Arabie Saoudite, dans les conditions climatiques sèches et chaudes, sa prévalence est de 20% (**Tuma et Hess, 2001**).

1.2 Le calcul urinaire

Le mot calcul du latin « calculus », nom des petits cailloux utilisés par les comptables romains. Les calculs urinaires communément appelés « pierres aux reins » sont des agglomérations des cristaux durs qui se forment dans l'appareil urinaire et peuvent entraîner de vives douleurs. On entend par un calcul urinaire des concrétions cristallines, minérales, organiques ou médicamenteuses présentes dans le système urinaire. Ces concrétions causent un problème pour les reins et pour la fonction rénale et par conséquent amènent le malade à l'hémodialyse.

Ces calculs peuvent croître dans les reins et envahir le bassinet et les calices. Ils peuvent aussi descendre par les uretères jusqu'à la vessie (**Harrache, 1999 ; Jungers et al, 1989**).

1.3 Le système urinaire

L'appareil urinaire correspond à l'ensemble des organes dont le rôle consiste en l'expulsion après filtrage des déchets humains liquides sous forme d'urine. L'appareil urinaire est composé des reins, des uretères, de la vessie, de l'urètre et du méat urinaire, illustré dans la figure I.1. Ces organes sont essentiels au maintien de l'homéostasie par le contrôle de l'équilibre hydrique et de l'équilibre acido-basique.

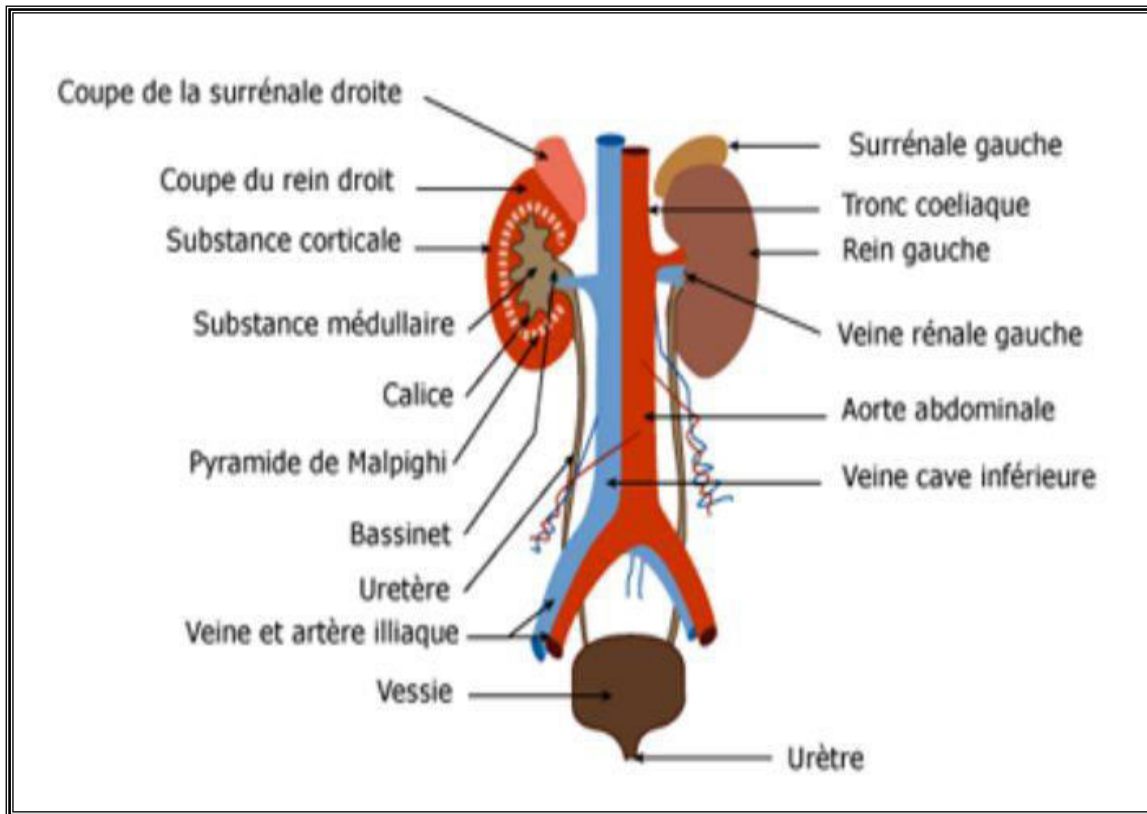


Figure I.1 : Schéma de l'appareil urinaire (Hanslik T et Flahault A, 2013)

Le rein humain est un organe complexe qui filtre les résidus du sang grâce à la production d'urine. Il assure aussi l'excrétion des déchets métaboliques et des produits exogènes, tout en conservant les éléments essentiels à l'organisme (Newman et al, 2005), la sécrétion de certaines hormones telles que la rénine (participe à la régulation du volume extracellulaire) et l'érythropoïétine (c'est une glycoprotéine produite dans le stroma rénale qui stimule la maturation des globules rouges) (Newman et al, 2005). Les deux uretères relient chaque rein à la vessie et permettent l'écoulement de l'urine vers la vessie. La vessie est un organe creux, sphérique, dont la paroi est musculaire ; elle stocke l'urine venant des uretères puis, lorsqu'elle est pleine, l'évacue vers l'urètre en contractant sa paroi musculaire. L'urètre, conduit séparé de la vessie par le col vésical, qui permet l'évacuation de l'urine qu'elle contient hors du corps ; il est entouré d'un sphincter, dit urétral, qui se ferme pendant le remplissage de la vessie et s'ouvre lors des mictions.

L'urine possède une composition complexe et variant suivant les individus, le régime alimentaire ainsi que leur propre métabolisme. Sa teneur est généralement riche en ions tel que le calcium, l'oxalate, les urates et les phosphates, les protéines capables pour former des substances peu solubles comme l'oxalate. Selon la localisation dans l'appareil urinaire, il existe plusieurs types de calcul : rénal, urétéral et vésical.

II Les constituants lithiasiques

Les constituants lithiasiques sont les espèces qui forment la concrétion solide qui est le calcul urinaire. Ces structures cristallines sont majoritairement des composés minéraux, organiques ou mixtes, mais certaines sont des médicaments. Ils peuvent être cristallins, amorphes, protéiques ou huileux.

Le tableau I.1 rassemble les constituants minéraux avec leur dénomination chimique et minéralogique, leur système cristallin et leur formule chimique.

Tableau I.1: Constituants minéraux des lithiases urinaires (Daudon et al, 1989 ; Cotton et al, 2014).

Dénomination chimique	Formule	Dénomination minéralogique	Système Cristallin
Oxalate de calcium monohydraté	$\text{Ca}(\text{COO})_2, \text{H}_2\text{O}$	Whewellite	Monoclinique
Oxalate de calcium dihydraté	$\text{Ca}(\text{COO})_2, 2\text{H}_2\text{O}$	Weddellite	Quadratique
Oxalate de calcium trihydraté	$\text{Ca}(\text{COO})_2, 3\text{H}_2\text{O}$		
Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatite	Hexagonal
Carbonate-apatites (Carbapatites)	Ex : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH}, \text{CO}_3)_2$	Carbonatapatites	Hexagonal
Phosphate double de calcium et de magnésium	$\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_4)_6\text{HPO}_4$	Whitlockite	Hexagonal
Phosphate octocalcique	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6, 5\text{H}_2\text{O}$		Triclinique
Hydrogénophosphate de calcium	$\text{Ca HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	Brushite	Monoclinique
Phosphate diacide de calcium	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4), \text{H}_2\text{O}$		Triclinique
Phosphate ammoniaco-magnésien	$\text{Mg NH}_4\text{PO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$	Struvite	Orthorhombique
Hydrogénophosphate de magnésium	$\text{Mg HPO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$	Newberyite	Orthorhombique
Carbonates de calcium	CaCO_3	Calcite Aragonite	Rhomboédrique Orthorhombique
Sulfate de calcium	$\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	Gypse	Monoclinique

Le tableau I.2 présente les produits organiques avec leur dénomination chimique et leur formule.

Tableau I.2: Constituants organiques des lithiases urinaires (**Daudon et al ; 1989 ; Cotton et al, 2014**)

Dénomination chimique	Formule
Acide urique anhydre	$C_5 H_4 O_3 N_4$
Acide urique dihydraté	$C_5 H_4 O_3 N_4, 2H_2O$
Urate acide d'ammonium	$NH_4 C_5 H_4 O_3 N_4$
Urate acide de calcium	$Ca(C_5 H_4 O_3 N_4)_2, 2H_2O$
Urate acide de potassium	$K C_5 H_3 O_3 N_4$
Urate acide de sodium	$Na C_5 H_3 O_3 N_4, H_2O$
Xanthine	$C_5 H_4 O_2 N_4$
Hypoxanthine	$C_5 H_4 O N_4$
2,8-Dihydroxy adénine	$C_5 H_5 O_2 N_5$
8-Hydroxy adénine	$C_5 H_5 O N_4$
Cystine	$(-S-CH_2-CH(NH_2)-COOH)_2$
Cholestérol	$C_{27} H_{46} O$
Triglycérides (dont Trioléine)	Variées ($C_{57} H_{104} O_6$)
Paraffines	Variées

Enfin le tableau I.3 réunit les composés médicamenteux des lithiases urinaires

Tableau I.3: Constituants médicamenteux des lithiases urinaires (**Jungers et al, 1989 ; Daudon, 1993**).

Dénomination chimique	Formule
Sulfamides	Variées
Acide glafénique	$C_{16} H_{11} O_2 N_2 Cl$
Acide hydroxyglafénique	$C_{16} H_{11} O_3 N_2 Cl$
Triamtérène (+ métabolites)	$C_{12} H_{11} N_7$
Oxypurinol	$C_5 H_4 O_2 N_4$
Phénazopyridine	$C_{11} H_{11} N_5$
Protéines	Variées

Cependant, il existe autant de constituants que de formes cristallines, individualisées pour une même espèce chimique. A titre d'exemple, l'oxalate de calcium peut compter trois constituants distincts correspondants aux formes cristallines : monohydratée, dihydratée et trihydratée et les phosphates peuvent aussi compter plusieurs constituants distincts tels que le phosphate de calcium carbonaté amorphe, hydrogénophosphate de calcium dihydraté, hydrogène phosphate de calcium monohydraté, hydroxylapatite (voir Tableau I.1). Il existe quatre principaux types de lithiases classées selon leur composition : les lithiases oxaliques, les lithiases phosphatiques, les lithiases uriques et les lithiases cystiniques.

III La lithogénèse :

Le terme de lithogénèse regroupe l'ensemble des processus qui conduisent au développement d'un calcul dans les voies urinaires (**Daudon et al, 2012**). Afin d'expliquer les mécanismes concrètement impliqués dans la formation d'un calcul urinaire, six théories ont été proposées. Cependant, chacune d'elle est insuffisante pour rendre compte de tous les facteurs responsables du développement d'un calcul dans les voies urinaires (**Boistelle et Berland, 1992 ; Harrache, 1999**).

III.1 Les étapes de la lithogénèse :

La formation d'un calcul passe par une succession d'étapes dont le déroulement dépend du milieu environnant. Certaines phases de la lithogénèse considérée comme instantanées ou rapides comme la germination cristalline, d'autres plus lentes ou beaucoup plus lentes comme les phénomènes de croissance cristalline et d'agrégation cristalline. Le processus de la lithogénèse peut être décomposé en sept étapes qui se succèdent ou s'entremêlent au cours de la formation d'un calcul.

Ces étapes sont les suivantes (**Fellahi, 2011; Daudon, 2000 ; Daudon et al, 2012**):

- 1- La sursaturation en une ou plusieurs substances cristallines.
- 2- Le passage de l'état soluble à l'état solide ou germination cristalline.
- 3- La croissance ou l'augmentation de la taille des particules cristallines.
- 4- L'agrégation des cristaux.
- 5- L'agglomération cristalline.
- 6- La rétention des particules cristallisées.

7- La croissance du calcul.

III.1.1 La Sursaturation urinaire :

La sursaturation se définit comme étant la concentration maximale (produit de solubilité K_{ps}) d'un ou de plusieurs solutés au-delà de laquelle toute fraction supplémentaire de la substance considérée reste insoluble dans l'urine (Daudon, 2004 ; Herbert, 1978 ; Boistelle, 1992). La sursaturation des urines est donc le mécanisme fondamental de l'apparition des germes cristallins. C'est la première étape du processus lithogène (Daudon et al, 2000 ; Daudon et al, 2012).

Les principales causes de sursaturation sont regroupées dans la figure I.2 (Daudon et al, 2012; Djaroud, 2013).

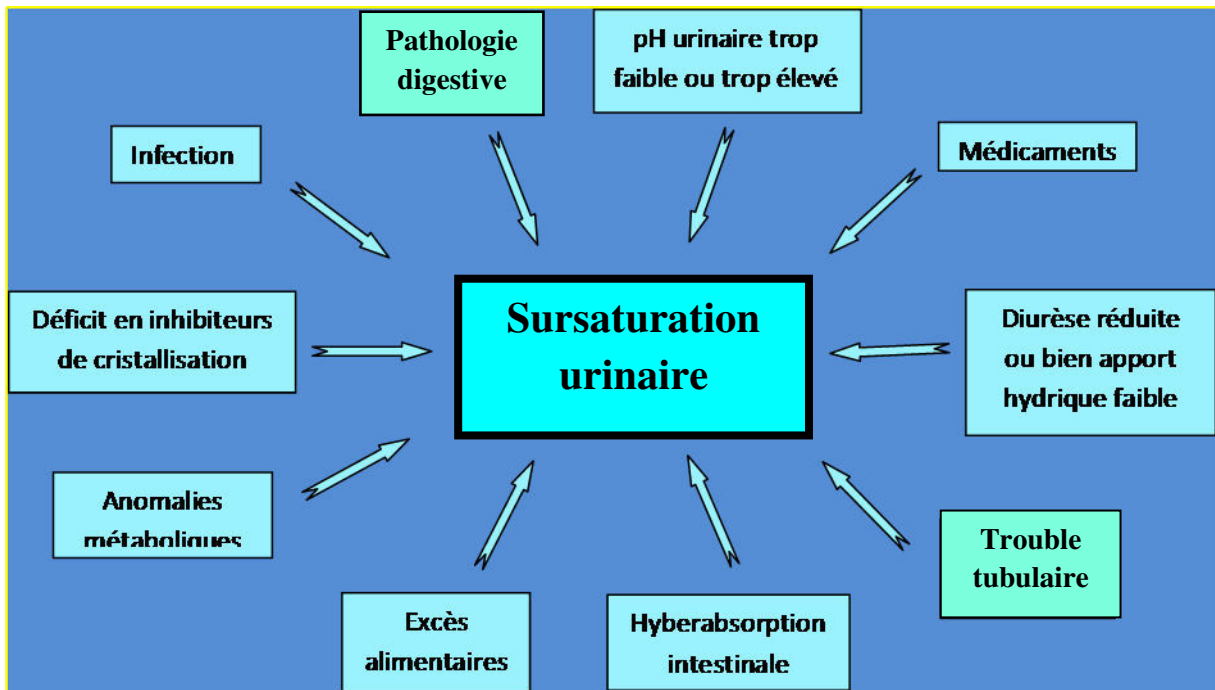


Figure I.2: Facteurs inducteurs de sursaturation urinaire (Daudon et al, 2012)

Par conséquent, la survenue de la lithiase urinaire relève de plusieurs causes : les anomalies anatomiques, les causes métaboliques, les facteurs nutritionnels, les infections urinaires et la prise de certains médicaments (Daudon, 2005).

III.1.2 La germination cristalline :

Lorsque le niveau de sursaturation est suffisant, les molécules dissoutes non dissociées qui se sont formées à partir des ions en solution se rassemblent pour constituer des germes cristallins (**Daudon et al, 2012**). Cette étape de germination ou nucléation cristalline peut traduire différentes situations. On distingue essentiellement deux sortes de nucléation : nucléation homogène et nucléation hétérogène (**Boistelle, 1992; Daudon, 2000**)

- *La nucléation homogène* : elle correspond à la cristallisation directe d'une espèce cristalline dont le niveau de sursaturation est élevé (la sursaturation est supérieure au produit de formation d'une substance donnée (**Daudon, 1989 ; Daudon et al, 2000**)).
- *La nucléation hétérogène* : c'est la formation de nouveaux cristaux d'un support initial constitué par des cristaux d'une autre espèce, de bactéries, de cellules ou d'autre cristaux (**Doddametikurke et al, 2007**), elle s'observe pour des niveaux de sursaturation moindres (**Boistelle, 1985 ; Djaroud, 2013**).

Les urines humaines sont fréquemment sursaturées simultanément vis-à-vis de plusieurs substances. Si le produit de formation de l'une des substances est atteint, entraînant sa cristallisation dans l'urine, la présence de ces cristaux peut induire la cristallisation d'une seconde espèce pour laquelle le produit de formation n'est pas encore atteint. Ce mécanisme est responsable de la majorité des maladies lithiasiques observées aujourd'hui (**Daudon et al, 2012**).

III.1.3 La croissance cristalline :

Cette étape assure la transformation des germes cristallins initiaux mesurant quelques centaines d'angströms, en cristaux de plusieurs microns. Les cristaux possèdent au niveau de la couche externe des électrons libres qui peuvent attirer des cations présents dans l'urine. Il en résulte des sites de croissance à la surface de chaque face du cristal où s'effectue l'incorporation de nouvelles entités.

Cette croissance peut être stoppée par le blocage par des substances présentes dans le milieu (inhibiteur) (**Harrache, 1999 ; Monika et al, 2011**)

III.1.4 L'agrégation des cristaux :

L'agrégation cristalline contrairement à la croissance est un processus rapide mettant en jeu des phénomènes d'attraction électrostatique en fonction de la charge superficielle des cristaux. De ce fait, des particules volumineuses sont engendrées dans un délai très court inférieur au temps de transit de l'urine à travers le rein (**Daudon, 1989 ; Harrache, 1999**). Les agrégats ainsi formés sont susceptibles d'être retenus dans les segments terminaux des néphrons sur l'épithélium papillaire ou dans les cavités excrétrices du rein (**Daudon, 2008**).

III.1.5 L'agglomération cristalline :

Elle implique des macromolécules urinaires qui, par leur nombreuses charges négatives, peuvent se fixer à la surface des cristaux et favoriser secondairement la fixation de nouveaux cristaux sur les premiers en les organisant les un par rapport aux autres contribuant ainsi à l'architecture du calcul (**Daudon et al, 2012**).

Les macromolécules impliquées dans ce processus sont essentiellement des protéines comme Tam-Horsfall (THF), l'Albumine et l'Uropontine.

III.1.6 La rétention des particules cristallines:

Cette étape peut être considérée comme la première étape du processus lithogène proprement dit, à partir de laquelle des particules cristallines formées au cours des différentes phases de la cristallogénèse vont être retenues dans le rein ou les voies urinaires et vont croître pour former un calcul (**Daudon et al, 2008**).

Les interactions entre les cristaux et la surface des cellules épithéliales sont considérées aujourd'hui comme la principale cause de nidation et de formation d'un calcul (**Atmani et al, 1997 ; Berland, 1999**).

III.1.7 La croissance du calcul :

Le calcul peut grossir dans l'appareil urinaire. La vitesse de cette croissance du calcul initié par la rétention cristalline et ensuite très variable, dépendant des différents facteurs, souvent associés au (**Fellahi, 2011**):

- Augmentation de la concentration des substances lithogènes.
 - Diminution du pouvoir solvant des urines.
 - pH : l'acidité favorise la sursaturation en acide urique et en cystine, l'alcalinité celle des phosphates.
 - Existence d'un obstacle, anatomique ou fonctionnel sur les voies urinaires.
- Les principales étapes de la lithogénèse sont schématisées dans la figure I.3

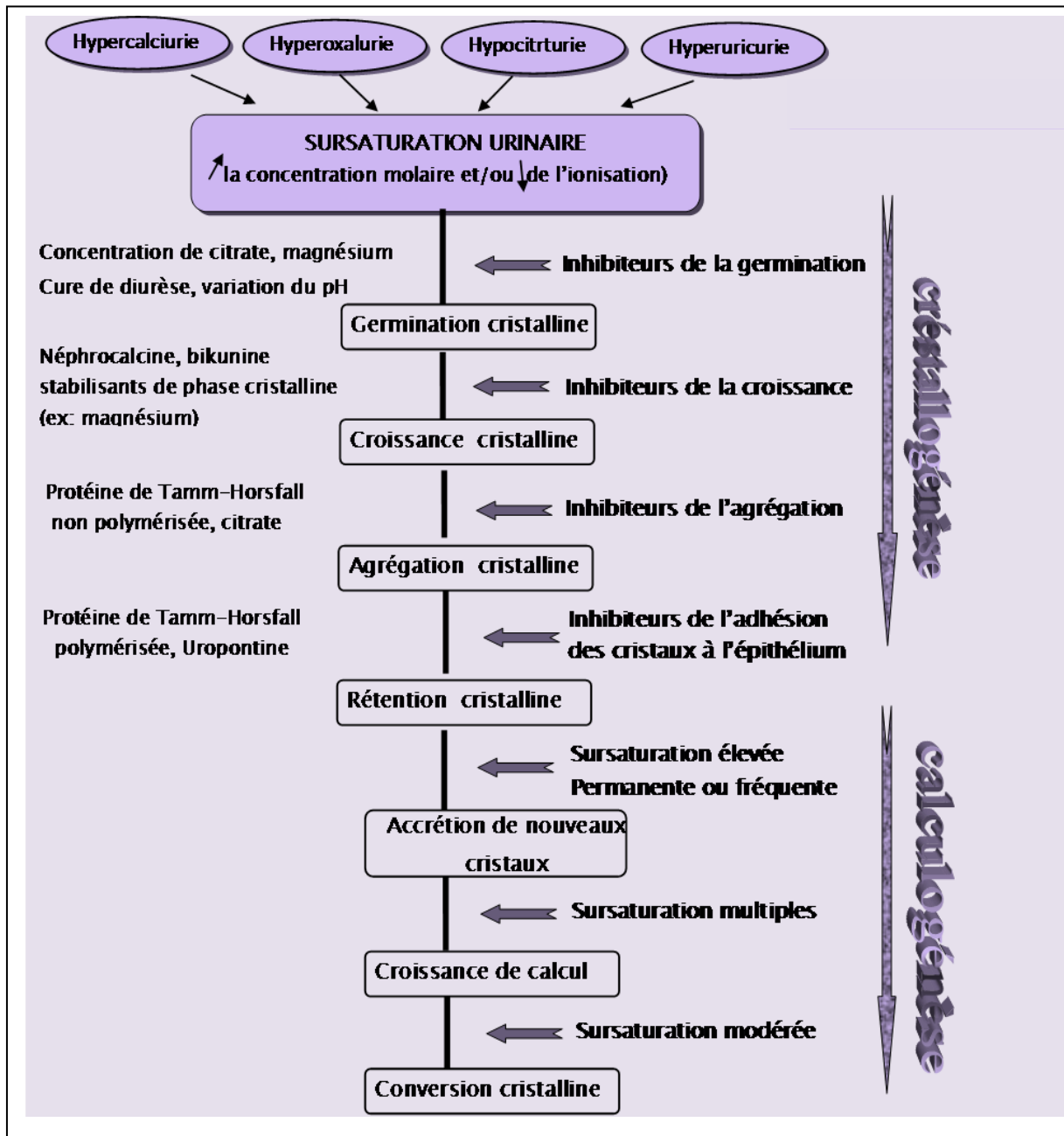


Figure I.3: Les principales phases de la lithogénèse (Daudon et al, 2012)

IV Les promoteurs de la lithogénèse :

Les promoteurs de la cristallisation sont des substances qui favorisent la formation des espèces insolubles dont les principaux sont : le calcium, l'oxalate et le phosphate (Monika et al, 2011 ; Herbert, 1978). Ils s'associent très souvent par deux ou par trois pour former une substance cristallisable qui elle même peut se présenter sous plusieurs espèces cristallines.

La cristallisation urinaire de ses espèces ne peut se produire que lorsque la concentration molaire de ses substances est supérieure à leur produit de solubilité (Iyad, 2008).

Les promoteurs sont regroupés dans la figure I.4 (Daudon et al, 2008) :

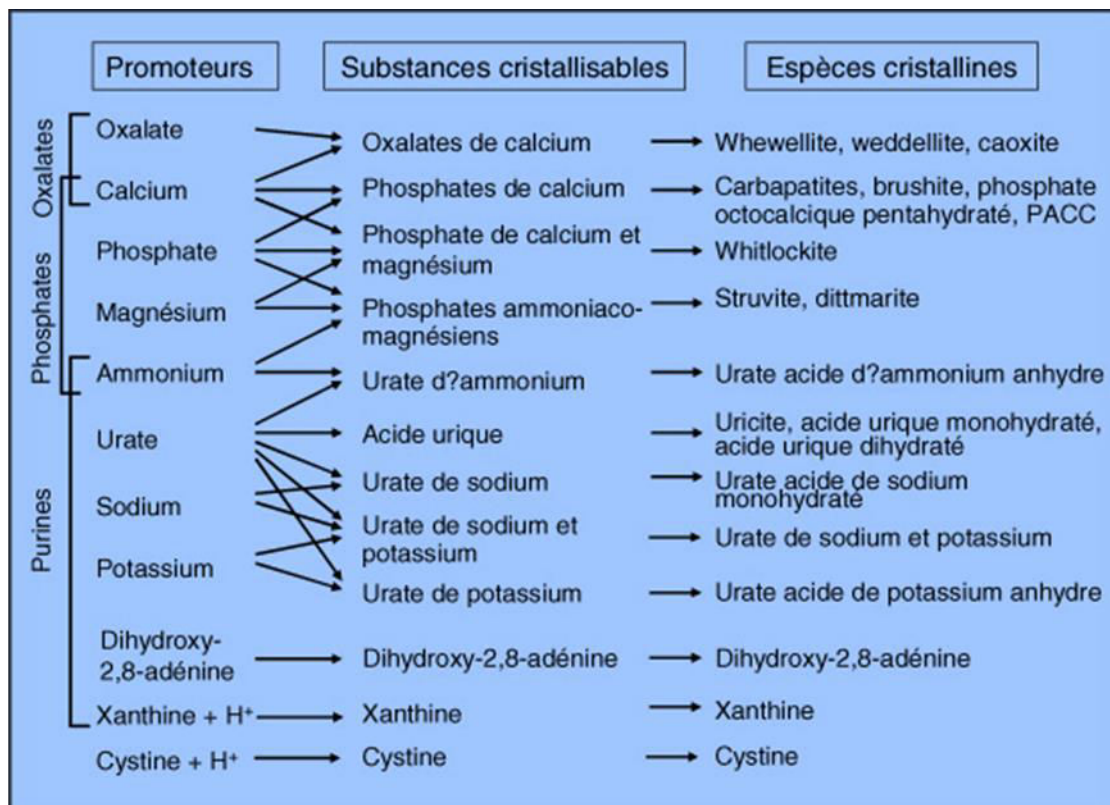


Figure I.4: Les différents promoteurs de substances cristallisables (Daudon et al, 2008).

V Les inhibiteurs de la lithogénèse :

Les inhibiteurs de la cristallisation sont définis comme des substances qui augmentent le seuil de sursaturation nécessaire à l'initiation de la nucléation, qui ralentissent la croissance la cristalline et qui inhibent secondairement la nucléation (Monika, 2011).

Les inhibiteurs naturellement présents dans l'urine ont pour effet d'empêcher la formation d'agrégats cristallins dans le tubule rénal, où les urines sont spontanément sursaturées. Les inhibiteurs peuvent être classés en deux groupes selon leur mécanisme d'action (**Daudon et al, 2012**) :

- ❖ Les inhibiteurs de faible poids moléculaire: ce sont des molécules ioniques urinaires mono ou poly atomique agissent en formant un complexe soluble avec les substances cristallisables et diminuant ainsi la sursaturation tel que les ions : citrate, magnésium et pyrophosphate (**Inge, 1999**).
- ❖ Les inhibiteurs de haut poids moléculaire: ils constituent les inhibiteurs proprement dites, exercent leur action directement sur les cristaux en bloquant les sites de croissances situés à leur surface (**Fellahi, 2011**).

Les principaux inhibiteurs urinaires connus à ce jour sont indiqués dans le tableau I.4.

Tableau I.4 : Les principaux inhibiteurs urinaires (**Daudon et al, 2008**)

Inhibiteurs de faible poids moléculaire	Cible	Inhibiteurs macromoléculaires	Cible
<i>Cations</i>		<i>Protéines</i>	
Zn ²⁺	OxCa	Protéine de Tamm-Horsfall	OxCa
Zn ²⁺	OxCa	Néphrocalcine	OxCa
Mg ²⁺	OxCa	Uropontine	OxCa, PCa
<i>Anions</i>		Bikunine	OxCa
Citrate	OxCa, PCa	Fragment 1 de la prothrombine	OxCa
Isocitrate	OxCa, PCa	Fibronectine	OxCa
Phosphocitrate	OxCa, PCa	Calprotectine	OxCa
Pyrophosphate	OxCa, PCa	Lithostathine	CaCO ₃
Aspartate	OxCa	<i>Glycosaminoglycanes</i>	
Glutamate	OxCa	Sulfate de chondroïtine	OxCa, acide urique, urates
Hippurate	OxCa	Sulfate d'héparane	OxCa
<i>Cofacteurs d'inhibition</i>		Sulfate de kératane	OxCa
Variabilité du pH	Acide urique, urates, PCa, struvite	Sulfate de dermatane	OxCa
Force ionique	Tous cristaux	Acide hyaluronique	OxCa, PCa

V.1 Les inhibiteurs de faibles poids moléculaire :

Les trois principaux inhibiteurs inorganiques sont :

V.1.1 Le citrate :

Parmi les inhibiteurs de faible poids moléculaire le plus important, c'est un acide carboxylique, il possède un fort pouvoir complexant du calcium, magnésium et sodium dans le milieu physiologique (pH=7) (**Monika, 2011**).

Il contribue de ce fait à réduire efficacement la sursaturation et la cristallisation des sels calciques aussi bien de l'oxalate que du phosphate de calcium.

Le citrate contribue par fixation à la surface des cristaux urinaires à réduire la croissance et l'agrégation cristallines. De plus il possède une affinité pour les ions phosphates avec les quels il forme des ions phosphocitrate eux-mêmes doués de propriétés inhibitrices de la cristallisation des phosphates de calcium (**Daudon et al, 2000 ; Harrache, 1999 ; Abdelmalek et al, 2001**).

V.1.2 Le magnésium :

Le magnésium occupe une place particulière par son abondance dans l'urine. Il est capable de complexer l'oxalate et donc de réduire la sursaturation oxalocalcique (**Harrache, 1999 ; Daudon et al, 2000 ; Abdelmalek et al, 2001 ; Djaroud, 2013**). Cet effet semble modeste, d'autant que le magnésium est un cation divalent et qu'il peut de ce fait, entrer en compétition avec le calcium vis-à-vis du citrate (**Daudon et al, 2012**).

Dans une solution sursaturée en oxalate de calcium (2 m mol/l) le magnésium réduit la croissance par 50%. Le magnésium s'incorpore à la structure moléculaire du phosphate amorphe de calcium en le stabilisant sous la forme cristalline moins volumineuse que celle vers laquelle il évolue spontanément (**Monika et al, 2011**).

V.1.3 Le Pyrophosphate :

Le pyrophosphate provient de l'hydrolyse des nucléotides triphosphates c'est un puissant anti cristallisants calcique (**Daudon et al, 2000**). Malgré son faible concentration dans les urines, il joue un rôle anti cristallisant dix fois plus marquée pour les phosphates que pour les oxalates.

Il inhibe principalement la germination cristalline des phosphates de calcium et à un moindre degré, leur croissance et leur agrégation (**Daudon et al, 2000**). Il ralentit la cinétique de conversion des phosphates de calcium amorphes en phosphates de calcium cristallisés (**Herbert, 1978 ; Heughebaert, 1984**). Il exerce aussi un effet inhibiteur sur la croissance des cristaux d'oxalate de calcium (**Monika et al, 2011**).

V.2 Inhibiteurs macromoléculaires :

Les inhibiteurs macromoléculaires sont des polysaccharides ou le plus souvent des protéines porteuses de chaîne glucidiques. La concentration urinaire de ces inhibiteurs est souvent très faible. Ils agissent par adsorption à la surface des cristaux grâce à leurs nombreuses charges anioniques liées à la présence de groupement acides (COO^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) (**Daudon, 2008 ; Daudon et al, 2012**)

Leur fixation sur les cristallites entraîne une inhibition de la croissance et de l'agrégation cristalline. Les cristaux peuvent ainsi s'évacuer plus facilement dans l'urine (**Daudon et al, 2000**).

Tableau I.5 : Les principaux inhibiteurs avec leurs effets sur la cristallisation (**Monika et al, 2011**).

<i>Inhibiteurs</i>	<i>Effet sur la cristallisation</i>
Citrate	Inhibiteur de Croissance
Magnésium	Inhibiteur de Croissance
Pyrophosphates	Inhibiteur de Croissance et Agrégation
Osteopontine	Inhibiteur de Nucléation, Croissance et Agrégation
UPTF1	Inhibiteur de Croissance, Agrégation et Adhésion
Tamm-Horsfall (THP)	Promoteur de Nucléation et Croissance Inhibiteur de l'Agrégation
Glycosaminoglycans	Inhibiteur de Croissance, Agrégation et Adhésion
Lithostathine	Inhibiteur de Croissance
Nephrocalcine	Inhibiteur de Croissance et Agrégation

Certains inhibiteurs macromoléculaires contribuent aussi à empêcher l'adhésion des cristaux à la surface des cellules et s'opposent ainsi efficacement à la rétention des particules à l'intérieure des néphrons (**Daudon et al, 2012**).

De nombreuses molécules ont été identifiées à ce jour, parmi eux : le protéine Tamm-Horsfall (THF), Uropontine (Osteopontine), Fragment 1 de la prothrombine (UPTF1), Nephrocaline (NC) et Lithostathine (**Monika et al, 2011; Daudon et al, 2000**).

VI L'influence de pH urinaire :

Le pH urinaire exerce une influence considérable sur plusieurs molécules promotrices et inhibitrices de la lithogène. Cet effet se répercute nécessairement sur l'équilibre ionique des urines, l'efficacité de l'inhibition, le risque de la cristallisation spontanée de certaines espèces comme l'acide urique, les urates et les phosphates (**Daudon et al, 2000**). De même, le pH urinaire exerce une action déterminante sur la solubilité de ces espèces. Il influence ainsi les processus de nucléation hétérogène entre l'oxalate de calcium et les espèces dont la solubilité dépend du pH (**Boistelle et Berland, 1992**). Le pH physiologique varie entre 5,5 et 7.

VI.1 L'effet de l'acidité :

Plusieurs espèces cristallines sont faiblement solubles en urine acide, c'est le cas de l'acide urique de la cystine et de la xanthine. Un pH acide (< 5,3) favorise la précipitation de l'acide urique donc une urine en permanence acide et particulièrement propice au développement d'une lithiase urique (**Daudon et al, 2004 ; Daudon et al, 2012**). Cette cristallisation peut faciliter celle de l'oxalate de calcium et favoriser les processus de nucléation hétérogène (**Daudon et al, 2000**).

La cystine et la xanthine sont présentes en faible concentration. Ces substances ont tendance à cristalliser facilement en urine acide (**Daudon et al, 2012**).

VI.2 L'effet de l'alcalinité urinaire :

Lorsque le pH dépasse 6 la précipitation de phosphate de calcium sous forme de carapatite ou de phosphate amorphe de calcium carbonate est fréquente aussi bien chez les sujet normaux que lithiasiques (**Daudon et al, 2000 ; Heughebaert, 1984**).

La brushite peut se former en urine hypercalciurique de pH supérieure à 6, des cristaux en aiguilles et baguettes de grande dimension (souvent $\geq 50 \mu\text{m}$) s'agrégeant facilement pour former des particules encore plus volumineuses (**Daudon et al, 2000 ; Daudon et al, 2004**).

Lorsque le pH est supérieure à 7,5 en présence d'une hyperammoniogénèse urinaire, il existe un risque de précipitation de phosphate ammoniacomagnésien (struvite) et également d'urate d'ammonium si l'uraturie est élevée (**Daudon, 2012**).

Tableau I.6 : Domaine usuel de pH favorisant la précipitation des principales espèces cristallines observées dans les urines (**Daudon et al, 2000**).

<i>Principales espèces cristallines</i>	<i>Domaine usuel de pH</i>
Acide urique dihydraté	4,7 – 5,4
Urates amorphes complexes	5,2 – 5,8
Weddellite	5,3 – 6,6
Whewellite	5,3 – 6,8
Brushite	5,7 – 7,0
Carbapatite et PACC	5,9 – 7,5
Struvite	6,8 – 8,2
Urate acide d'ammonium	7,4 – 8,5

VII Les Théories de la lithogénèse :

La lithiase urinaire est une pathologie plurifactorielle complexe qui nécessite la compréhension des mécanismes impliqués dans la lithogénèse.

Afin d'expliquer les mécanismes concrètement impliqués dans la lithogénèse, différentes théories ont été distingués (**Jungers et al, 1989; Boistelle et Berland, 1992**). Cependant, chacune d'elles est insuffisante pour rendre compte de tous les facteurs favorisant la formation d'un calcul dans les voies urinaires (**Daudon, 1989; Munoz Martinez, 2004**).

VII.1 Théorie de la sursaturation cristallisation :

L'urine contient différents solutés en concentration molaire supérieur au produit de solubilité de ces substance, facilitent ainsi la formation des cristaux urinaires (**Jungers et al, 1989; Hennequin et al, 1993**).

Cette théorie suppose que l'urine des sujets lithiasiques est plus saturée que celle des sujets normaux (**Jungers et al, 1989**). Or d'autres études (**Robertson et al, 1968; Berland et al, 1984; Marangella et al, 1985**) montrent qu'il n'ya pas une différence dans le degré de sursaturation urinaire chez ces deux populations. En effet, la présence des cristaux dans les urines est un facteur nécessaire, mais insuffisant pour initier la formation d'un calcul.

VII.2 Théorie du déficit en inhibiteurs de cristallisation :

Les urines sont un milieu sursaturé naturellement en dehors du contexte lithiasique.

Puisque les urines de sujets normaux et les urines de sujets lithiasiques ont le même niveau de sursaturation et que les secondes ont tendance à cristalliser, ceci implique que les urines normales contiennent des substances capables d'empêcher la cristallisation des solutés en sursaturation et que l'on appelle « inhibiteurs ».

De nombreux travaux (**Robertson et Peacock, 1972; Bresleau et Pak, 1980; Gambaro et al, 1986; Ligabue et al, 1986 ; Boistelle et Berland, 1992; Daudon et al, 1994; Atmani, 2001**) in vitro ainsi que d'autres sur des rats rachitiques (**Thomas et Howard, 1959**) ont confirmé l'existence d'un pouvoir inhibiteur réduit dans les urines des sujets lithiasiques, par rapport aux urines des sujets normaux.

Diverses substances présentes dans les urines sont identifiées comme étant responsables de ce pouvoir inhibiteur. Chaque substance inhibitrice possède un pouvoir inhibiteur différent et un mode d'action s'exerçant à des degrés divers sur une ou plusieurs étapes de la lithogénèse (**Daudon et al, 1994 ; Boistelle et Berland, 1992 ; Berland et Olmer, 1991**).

VII.3 Théorie de la matrice protéique lithogène :

Quelque soit la composition du calcul cristallin il contient une matrice protéique même à un faible pourcentage (**Jungers et al, 1989**). Cette matrice protéique assure la cohésion des cristaux entre eux (**Warpehoski et al, 1981**).

Selon cette théorie les urines des sujets lithiasiques contiennent une protéine pathologique capable d'induire la cristallisation, d'assurer la croissance du calcul (**Hennequin et al, 1993**).

VII.4 Théorie des inducteurs de cristallisation :

Cette théorie repose sur le fait que certains cristaux induisent la cristallisation de cristaux d'une autre espèce (**Boistelle et Berland, 1992**). Dans ce cas, on considère le problème d'une manière sélective. En effet, certains lithiasiques calciques récidivants ont une uraturie élevée et présentent une sursaturation en urate monosodique (**Robertson et al, 1973; Coe et al, 1980**). Ce dernier est susceptible de précipiter avec des muco-polysaccharides, qui sont des inhibiteurs de la cristallisation oxalocalcique, en formant un gel, les empêchant de jouer leur rôle d'inhibiteur de la cristallisation oxalo-calcique.

Selon divers auteurs (**Robertson et al, 1976; Pak et al, 1977; Pak et al, 1979; Ceo et al, 1980**) les sursaturations en brushite et en urate acide de sodium facilitent la nucléation de l'oxalate de calcium et donc la formation de calcul oxalocalcique.

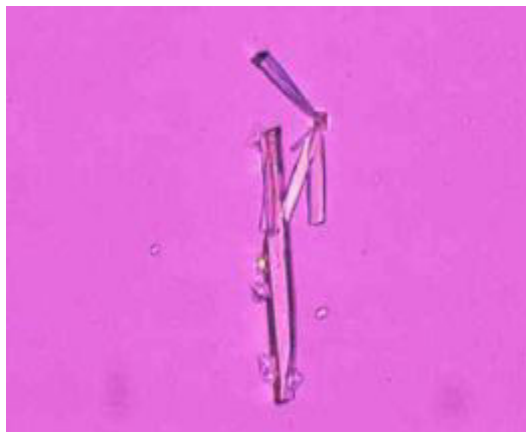


Figure I.5: cristallisation hétérogène entre brushite et weddellite
(**Daudon, 2003**)

Des auteurs (**Pack et Holt, 1976**) ont montré que les urines des sujets lithiasiques oxalocalciques étaient sursaturées en brushite et qui était capable d'induire une nucléation hétérogène de l'oxalate de calcium dans les urines.

VII.5 Théorie de la lithogénèse infectieuse :

Cette théorie se base sur la relation étroite existante entre l'infection par des germes uréolytiques et la présence de struvite (phosphate ammoniaco-magnésien hexahydraté) dans les calculs de l'infection (**Jungers et al, 1989**).

D'autres germes non uréasique favorisent la formation et la croissance de certains calculs.

VII.6. Théorie des corpuscules papillaires calcifiés :

Randall (**Randall, 1936**) a découvert pour la première fois l'existence de lésions papillaires calcifiées. Cette théorie est fondée sur la présence de plaques de calcification papillaires dont certains supportent des petits calculs chez des sujets sans antécédent lithiasiques. Les solutés urinaires peu solubles peuvent cristalliser par nucléation hétérogène sur la lésion calcifiée papillaire et former un calcul. Une fois le calcul est grand il se détache de la papille emportant avec lui la calcification. La plaque de Randall est un processus lithogène particulier.

L'enjeu épidémiologique est important puisque près de 25% des calculs se forment aujourd'hui sur une calcification papillaire (**Daudon et Bazin, 2007**).




Figure I.6: Calcul oxalocalcique formé à partir d'une calcification papillaire (**Daudon et Bazin, 2007**)

VII.7. Théorie du corps étranger :

Cette théorie est fondée sur la présence des cristaux d'une espèce donnée sur un support constitué par des corps étrangers tel que les fils résiduels d'une intervention chirurgicale, des sondes, poils cutanés....(**Jungers et al, 1989**).



Figure I.7: Calcul développé autour d'une sonde (**Morgan et al, 2005**)



Chapitre II :
Les phosphates
et la lithogénèse

Introduction :

La première étape dans la formation des calculs urinaires est la sursaturation du milieu urinaire. L'urine contient différents solutés en concentration molaire supérieure au produit de solubilité (K_{ps}) de ces substances, ce qui favorise la formation de cristaux urinaires (Daudon et al, 2004 ; Boistelle et Berland, 1992 ; Monika et al, 2011). La plupart des calculs urinaires contiennent du calcium, généralement sous forme d'oxalate, de phosphate ; le plus souvent ces deux sels sont associés (Heughbaert, 1984). Les phosphates de calcium sont essentiellement représentés par les apatites telles que les carbonate-apatites $Ca_{10}(PO_4,CO_3)_6(OH,CO_3)_2$ et le monohydrogénophosphate de calcium ($CaHPO_4,2H_2O$) (Heughbaert, 1984 ; Boistelle et Berland, 1992). La formation de ces solides est liée à la composition des urines. En effet, des urines normales sont périodiquement sous-saturées vis-à-vis des phosphates de calcium, tandis qu'elles sont presque toujours sursaturées vis-à-vis des oxalates de calcium (Heughebaert, 1984). La germination d'un phosphate donné ne peut s'effectuer que dans une solution sursaturée vis-à-vis de ce phosphate (Manish et al, 2011 ; Heughebaert, 1984). Les études de cristallisation in vitro permettent de préciser les conditions cinétiques et thermodynamiques de formation et de croissance des espèces cristallines et l'influence de diverses substances inhibitrices sur le processus de cristallisation (Herbert, 1978 ; Pak, 1969 ; Antonia et al, 2002). La cristallisation in vitro peut être déclenchée par addition au milieu réactionnel des solutions apportant des ions calcium, oxalates ou phosphates, ou par ensemencement à l'aide des germes cristallines de l'espèce que l'on souhaite étudier (Bahri, 2005 ; Heughebaert, 1984).

La précipitation des phosphates de calcium a fait l'objet de plusieurs études dans des conditions différentes dépendantes de la température du milieu réactionnel, le niveau de sursaturation des solutions, le pH initial et la concentration des différents agents de cristallisation, ce qui donne différentes phases cristallines de phosphate de calcium (Fellahi, 2011 ; Ferreira et al, 2003 ; Oliveira et al, 2007 ; Roberto, 2009 ; Sekar et Suguna, 2011 ; Sujata et al, 2010 ; Pak, 1969).

Les principaux phosphates de calcium purs ou mélangés qui précipitent lors de la cristallisation et la formation des calculs urinaires sont (**Doré, 2004 ; Daudon et al, 2004 ; Sekar et Suguna, 2011**):

- * la carboxapatite (carbonate-apatite) ex : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH}, \text{CO}_3)_2$
- * le PACC (phosphate amorphe de calcium carbonaté) $\text{Ca}_w(\text{PO}_4)_x(\text{OH})_y(\text{CO}_3)_z, n\text{H}_2\text{O}$
- * la struvite (phosphate ammoniacomagnésien hexahydraté) : $\text{MgNH}_4\text{PO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$
- * la whitlockite (phosphate de calcium et de magnésium) : $\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_4)_6\text{HPO}_4$
- * la brushite (hydrogénophosphate de calcium DCPD) : $\text{CaHPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$
- * l'OCP (phosphate octocalcique pentahydraté) : $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2, 5\text{H}_2\text{O}$
- * l' HAP (l'hydroxyapatite) : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
- * la newberyite (l'hydrogénophosphate de magnésium trihydraté) : $\text{MgHPO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$

L'existence de ces différentes phases cristallines rend l'étude des phénomènes de précipitation des phosphates de calcium particulièrement difficile (**Pak, 1969 ; Heughebaert, 1984 ; Boistelle et Berland, 1992**).

Dans ce qui suit et issu d'une synthèse bibliographique, nous présenterons une description de la cristallisation dans le milieu urinaire des différents phosphates, leur aspect dans l'urine, le type de calcul qu'ils génèrent, leur caractérisation par Infra rouge (IRTF). Ces notions sont fondamentales et représentent l'outil que nous avons utilisé afin de suivre la cristallisation de certains phosphates calciques dans deux modèles que nous avons choisi, afin d'évaluer l'effet des extraits de plantes médicinales sur leur cristallisation.

I Cristallisation des différents phosphates de calcium

Les phosphates de calcium forment une famille de composés chimiques de structures et de compositions variables. Ils peuvent apparaître sous différentes formes : des hydrates, des hydroxydes ou des anhydres. Ils sont habituellement décrits par leur rapport molaire Ca/P (**Heughebaert, 19984**). Il existe au minimum cinq formes minérales de phosphates dans les urines : la carapatite, la struvite, la whitlockite, la brushite et le PACC (**Doré, 2004 ; Daudon et al, 2004**). La plupart des phosphates calciques sont sensibles à l'influence de l'environnement. Les propriétés de dissolution de ces phosphates de calcium dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques. Chaque phosphate de calcium possède son propre produit de solubilité qui est dépendant de sa concentration molaire, du pH et plus précisément de la concentration en calcium ionisé, de la concentration en ion PO_4^{3-} et/ ou HPO_4^{2-} (**Pak, 1969 ; Boistelle et Berland, 1992 ; Sujata et al, 2010, Ferreira et al, 2003**).

Le domaine de précipitation usuel des phosphates calciques dans l'urine se situe au dessus de pH=6. Mais certains phosphates notamment l'hydroxyapatite et la brushite peuvent cristalliser à un pH inférieure à 6 lorsque la calciurie et le produit phosphocalcique sont élevés (**Daudon et al, 2012 ; Daudon et al, 2004 ; Bahri, 2005**).

I.1 Cristallisation du phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC)

I.1.1 Identification par microscopie optique à polarisation

Les phosphates amorphes de calcium carbonatés nommés PACC sont retrouvés dans l'urine à des valeurs de pH voisines de la neutralité (peu acide) ou franchement alcalines sous forme de granulations de petite taille incolores, pouvant se regrouper en agrégats parfois visibles macroscopiquement (voir figure II.1) (**Doré, 2004 ; Daudon et al, 2012 ; Daudon, 2003**).



Figure II.1 : Granulations de PACC vue en lumière polarisée (Daudon, 2012)

Dans certains cas, ces granulations s'accompagnent d'une forme particulière de précipitation du PACC en grandes plaques minces aux contours irréguliers que l'on désigne sous l'appellation de plaques vitreuses (voir figure II.2) (Daudon, 2003 ; Daudon, 2013).

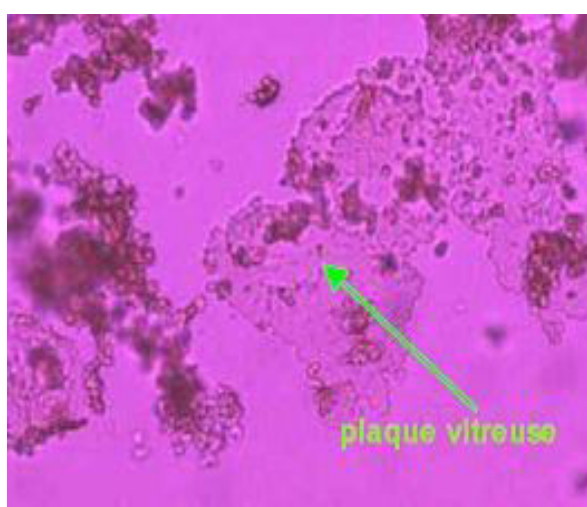


Figure II.2 : Plaque vitreuse de PACC (Daudon et al, 2004)

La figure II.2 montre les plaques translucides de phosphate amorphe de calcium carbonaté mêlées à des granulations plus ou moins en amas du même composé. Les granulations de phosphate amorphe de calcium carbonaté, vues en lumière polarisée, ne polarisent pas. Ces espèces sont essentiellement pH dépendantes (Daudon, 2003 ; Daudon et al, 2012).

La figure II.3 illustre la précipitation de phosphate amorphe de calcium carbonaté sous forme de cylindre de granulations non polarisantes. D'une manière générale, la précipitation des phosphates de calcium est sous la dépendance croisée du pH urinaire et du produit des concentrations molaires phosphocalcique. A $\text{pH} < 6,4$ le PACC traduit un produit phosphocalcique élevé par hypercalciurie et / ou hyperphosphaturie. Au-delà, la précipitation du PACC est facilitée d'autant moins dépendante du produit phosphocalciques que le pH est élevé, indiquant essentiellement l'alcalinité des urines. Les granulations de PACC n'ont pas une signification particulière chez les sujets sains. En revanche, chez les lithiasiques c'est un indicateur d'un risque de récurrence (Doré, 2004 ; Daudon et al, 2012).

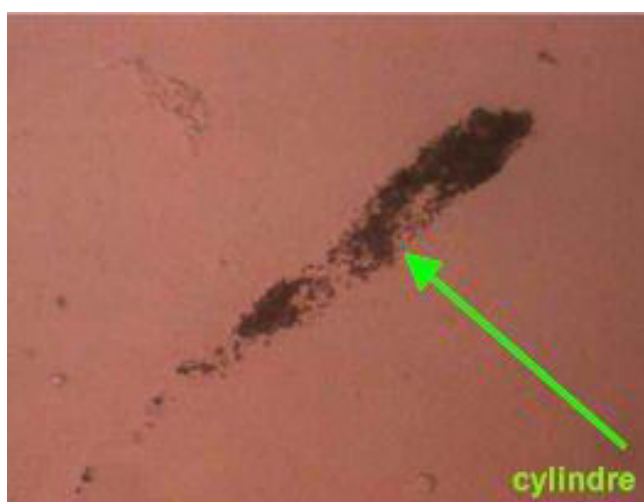


Figure II.3 : Granulations de PACC, sous forme de cylindre (Daudon et al, 2004)

II.1.2 Identification par spectroscopie infrarouge (IRTF)

L'identification moléculaire et cristalline de PACC peut se faire par un simple examen microscopique, en plus la confirmation de cette identification peut se faire par analyse spectroscopique comme la spectrophotométrie Infra rouge.

Le spectre IRTF de référence de PACC est représenté dans la figure II.4 (Fellahi, 2011).

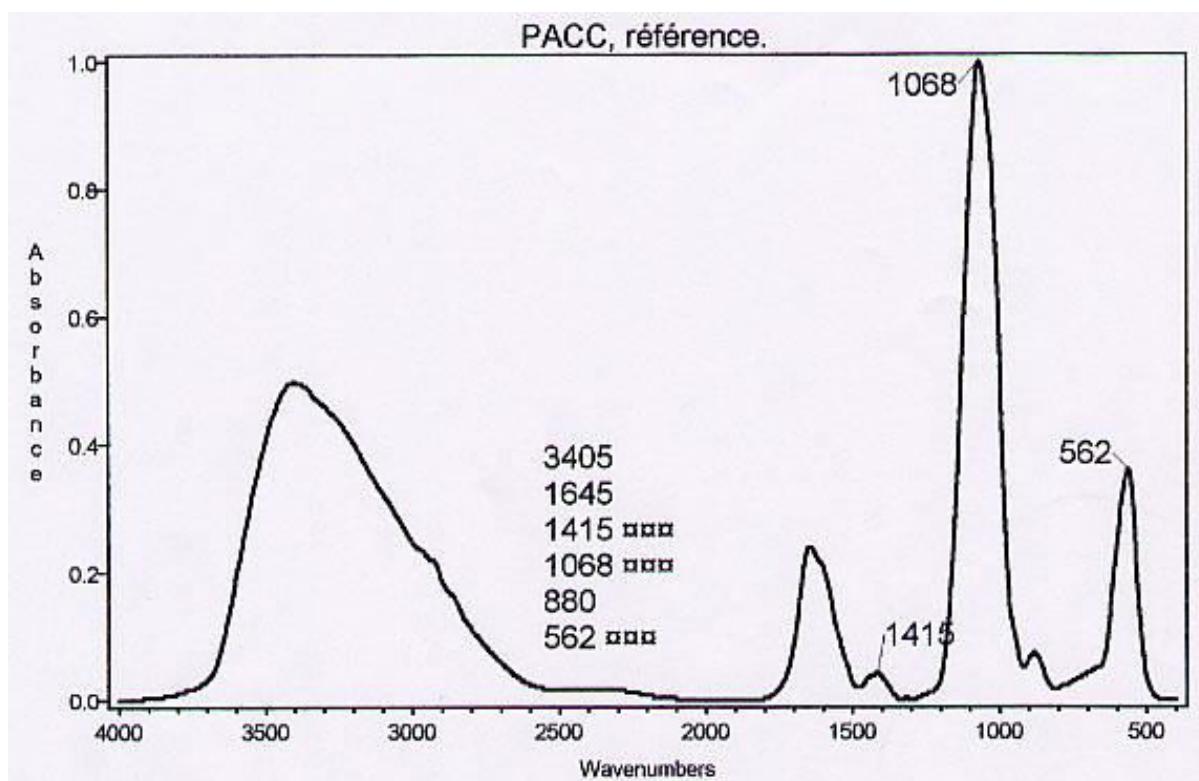


Figure 11.4: Spectre IR FT de référence de PACC (Fehani, 2011 ; Daudon et al, 2012)

Les vibrations caractéristiques du PACC sont principalement à 1068 cm^{-1} arrondie, large, entre 1150 et 1000 cm^{-1} centrée sur 1060 cm^{-1} (groupement phosphate PO_4^{3-}). Une seule bande large asymétrique à gauche à 562 cm^{-1} (bande secondaire de phosphate PO_4^{3-}). Une bande faible à 1415 cm^{-1} du groupement carbonate (CO_3^{2-}).

I.1.3 Calcul urinaire de PACC

La structure superficielle et interne du calcul est d'un grand intérêt pour apprécier les conditions de la lithogénèse et doit faire partie des informations à recueillir lors de l'analyse (Doré, 2004 ; Daudon et al, 2012). La morphologie du calcul dépend non seulement de sa composition moléculaire et cristalline, mais encore de l'environnement anatomique dans lequel il s'est développé. La couleur, la texture, les anomalies de structure sont autant d'informations qui renseignent sur la pathologie lithiasique et la présence d'autres calculs in situ (Daudon et al, 2012 ; Doré, 2004 ; Harrache, 1999). Les calculs urinaires de PACC pur n'existent pas. La présence de phosphate amorphe de calcium carbonaté dans les calculs est accompagnée d'autres espèces cristallines comme la carapatite (phosphate de calcium carbonaté).

Le phosphate amorphe de calcium carbonaté est un marqueur des processus de sursaturation forte en phosphate. La présence de PACC signe généralement des processus lithogènes actifs (**Doré, 2004**).

1.2 Cristallisation du phosphate de calcium carbonaté (carbapatite)

1.2.1 Identification par microscopie optique à polarisation

Le phosphate de calcium peut se présenter sous forme de phosphate de calcium carbonaté (carbapatite) de formule non stœchiométrique, cristallisé dans le système hexagonale (**Daudon et al, 2004**). Il est intéressant de noter que la composition de l'apatite phosphocalcique peut varier dans un domaine dont le rapport Ca/P varie entre 1,33 et 1,66. Ces composés sont appelés apatites déficientes. En fait, seul l'hydroxyapatite (HAP) de rapport 1,67 est stœchiométrique (**Daudon et al, 2014 ; Heughebaert, 1984**).

La composition variable des apatites carbonatées fait qu'il n'est pas possible de préciser leur produit de solubilité. Elles sont caractérisées par l'incorporation à la maille cristalline d'un nombre variable d'ions carbonate (**Heughebaert, 1984**).

Au cours de la précipitation des phosphates, les ions CO_3^{2-} (carbonates) peuvent se substituer aux ions PO_4^{3-} (apatite carbonatée de type B). Les ions CO_3^{2-} peuvent également se substituer aux ions hydroxyle OH^- (carbapatite de type A). Ils peuvent aussi se substituer aux ions OH^- et aux ions PO_4^{3-} (apatite carbonatée de type AB) (**Daudon et Doré, 1999 ; Bahri, 2005 ; Heughebaert, 1984**).

La carbapatite se rencontre principalement dans des urines alcalines, avec ou sans hypercalcurie. Les cristaux de carbapatite se présentent sous l'aspect de grains isolés qui correspondent en fait à des cristaux très petits (taille inférieure ou égale à $2 \mu\text{m}$) dont le grossissement insuffisant du microscope optique ne permet pas d'apprécier la forme réelle (voir la figure II.5) (**Daudon et al, 2004**).

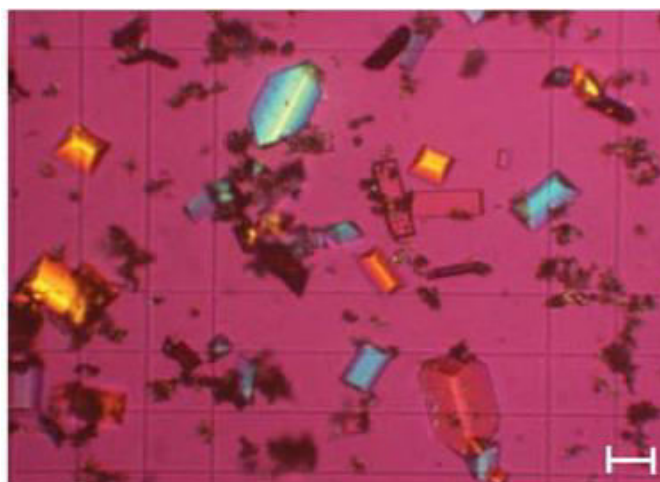


Figure II.5: Carbapatite (aspect de granulations) associée à des cristaux de struvite (cristaux rectangulaires) (Daudon et al, 2004)

II.2.2 Identification par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Les données spectrales IRTF de la carbapatite sont données dans le spectre illustré dans la figure II.6 (Daudon et al, 2012 ; Fellahi, 2011). La carbapatite se distingue du PACC sur les spectres IRTF par la présence d'une bande fine à 603cm^{-1} (Nguyen, 1997).

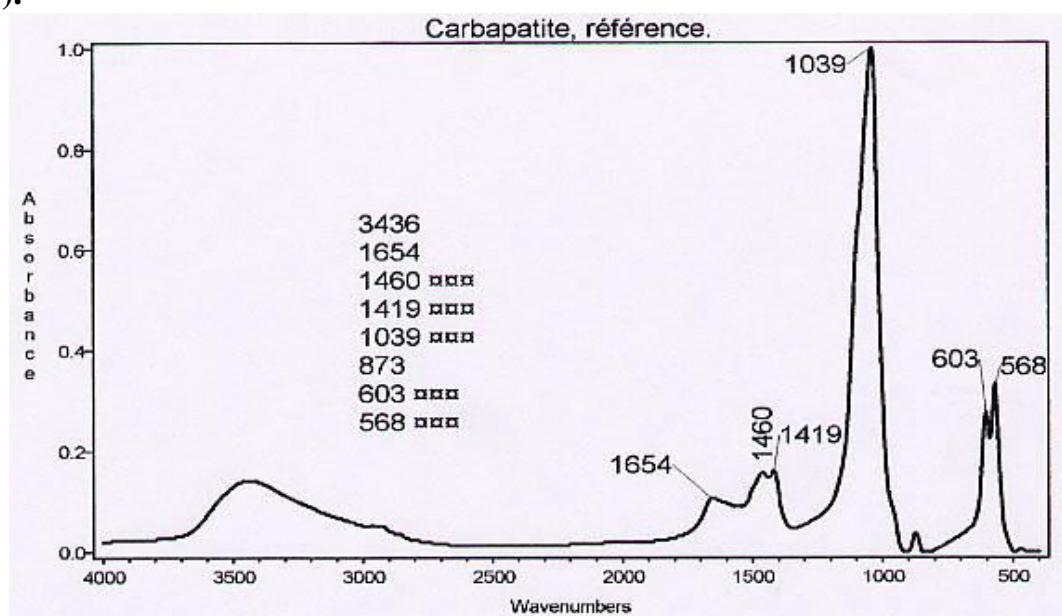


Figure II.6: Spectre IRTF de référence de la carbapatite (Fellahi, 2011 ; Daudon et al, 2012)

Les différentes vibrations IRTF caractéristiques du carbapatite sont : une bande large à 1039 cm^{-1} asymétrique à gauche, épaulée à 1100 cm^{-1} de PO_4^{3-} . Double pics pointues à

603 et 568 cm^{-1} (vibrations secondaires de phosphate PO_4^{3-}). Des vibrations de carbonate (CO_3^{2-}) à 1460 et 1419 cm^{-1} .

I.2.3 Calcul urinaire de carbapatite

La carbapatite, encore appelée Dahllite par les minéralogistes est extrêmement fréquente puisqu'elle est détectée par infrarouge dans près de 80% des calculs (Daudon et al, 1995 ; Nancollas et Koutsoukos, 1980 ; Harrache, 1997).

La figure II.7 représente un calcul vésical composé essentiellement de phosphate de calcium carbonaté (calcul de carbapatite pur ou majoritaire). La surface de ce calcul est homogène, finement rugueuse ou légèrement bosselée, faiblement microcristalline, de couleur homogène beige plus ou moins clair.



Figure II.7: Calcul de carbapatite majoritaire (Daudon et al, 2010)

Dans les calculs urinaires, l'espèce phosphatique la carbapatite, peut être associée au phosphate amoniacomagnésien (la struvite) comme la montre la figure II.8.



Figure II.8: Calculs de carbapatite associée à la struvite (carbapatite majoritaire).

En effet, la carbapatite peut être associée à la whewellite. Les calculs de carbapatite de ce type ont une morphologie très particulière (voir figure II.9), surface bosselée et brillante, d'aspect vernis, avec localement de fines craquelures dans le corps du calcul.



Figure II.9: Calculs de carbapatite associée au whewellite
(Daudon et al, 2010)

I.3 Cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium dihydraté (brushite)

I.3.1 Identification par microscopie optique à polarisation

Parmi les phosphates calciques, la brushite ou phosphate acide de calcium dihydraté est une espèce cristalline de formule chimique $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, rare chez les sujets non lithiasiques. Elle cristallise dans le système monoclinique.

La brushite cristallise habituellement dans des urines dont la calciurie et la phosphaturie sont fortes. C'est également une espèce pH-dépendante, elle se forme spontanément dans les urines relativement plus acides que les autres phosphates, même si elle peut les accompagner à des pH parfois élevés. De ce fait, le pH moyen de formation de la brushite dans les urines fraîches est voisin de 6,35 alors que celui des autres phosphates est proche de 7.

Les cristaux de brushite (la forme la plus acide des phosphates calciques) se présentent en baguettes souvent asymétriques, peu polarisantes (voir figure II.10(a)), comme elles peuvent se présenter sous forme de crayons (voir figure II.10(b)).

La brushite contrairement à beaucoup d'autres espèces cristallines, en baguettes, notamment les médicaments, présente la particularité de s'agréger par ses extrémités

ou, au contraire, de manière rayonnante à partir du milieu d'un cristal initial, conduisant alors parfois à la formation de véritables oursins cristallins (voir figure II.10(c)).

La brushite occupe une place particulière en raison de son aptitude à former, en urine hypercalciurique de pH supérieur à 6 des cristaux en aiguilles et baguettes de grande dimension qui s'agrègent facilement. A cela s'ajoute une propension à la nucléation hétérogène avec les cristaux de weddellite, également fréquents en urine hypercalciurique, ce qui fait de la brushite une espèce cristalline particulièrement lithogène (Daudon et al, 2000) (voir figure II.10(d)).

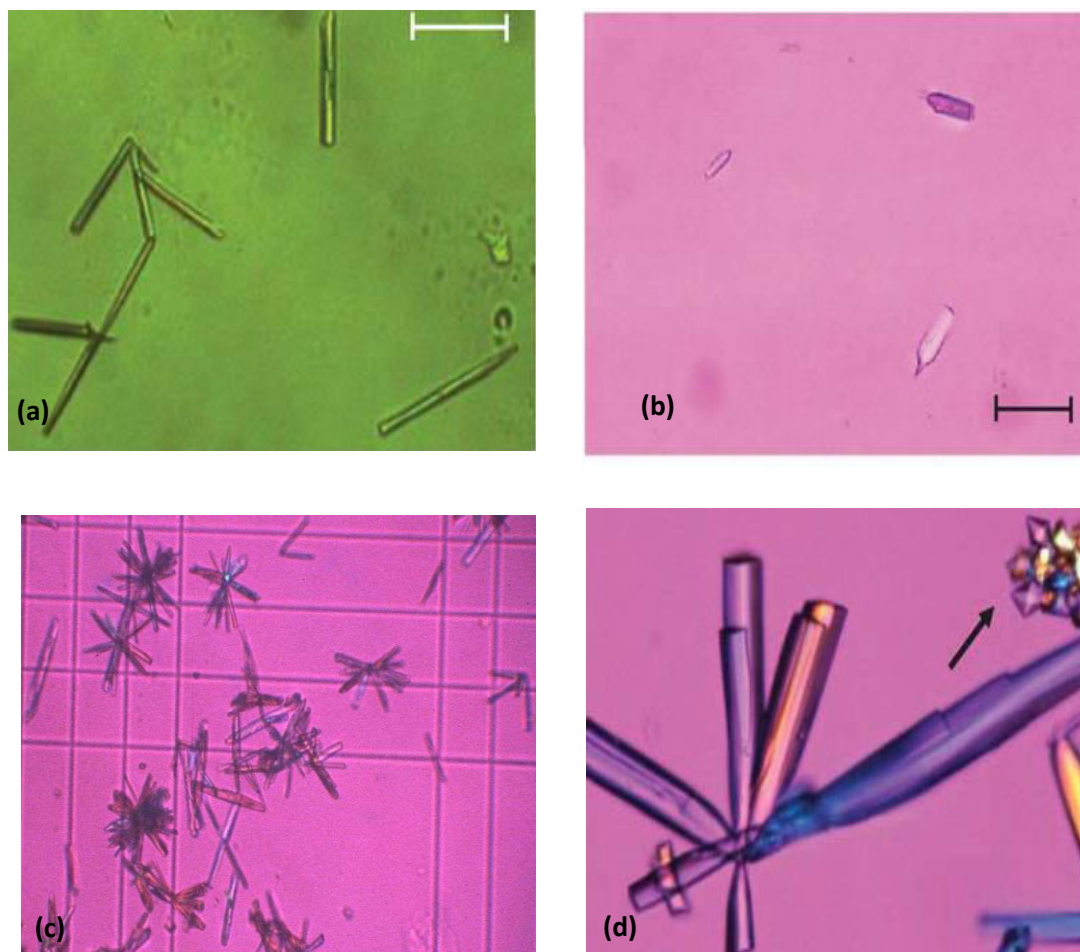


Figure II.10: Cristaux et agrégats de brushite sous différentes formes vus en lumière polarisée. a) : Cristaux de brushite en baguettes ; b) : Cristaux de brushite en forme de crayons ; c) : Agrégats de cristaux de brushite ; d) : Cristallisation hétérogène entre la brushite et la weddellite (Daudon et al, 2004)

I.4.2 Identification par spectroscopie infrarouge (IRTF)

La brushite, est une forme cristalline fortement calcium dépendante comme la weddellite puisqu'une hypercalciurie peut être détectée dans près de 85% des cas (Bertrand, 2004).

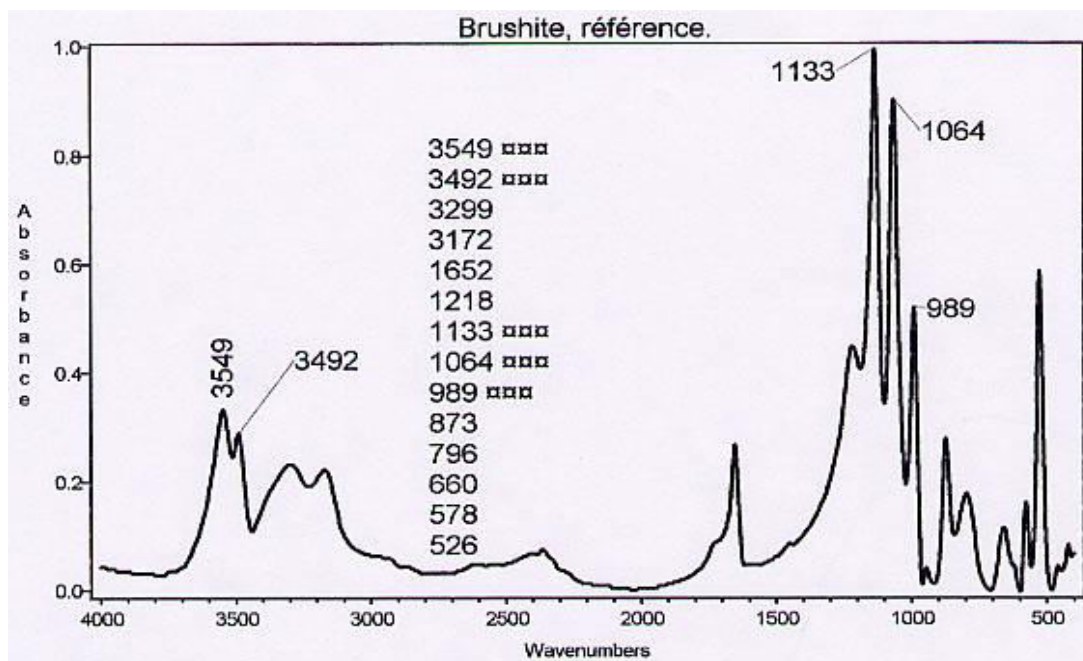


Figure II.11: Spectre IRTF de référence de la brushite (Fellahi, 2011 ; Daudon et al, 2012)

Les bandes IRTF caractéristiques de la brushite sont : double pics à 3549 et 3492 cm^{-1} (vibrations de valence de la molécule d'eau), triple pics à 1133, 1064 et 989 cm^{-1} du groupement phosphate PO_4^{3-} (voir figure II.11).

I.2.3 Calcul urinaire de brushite

Les calculs de brushite ont une surface pommelée en chou-fleur ou finement rugueuse de couleur beige à beige/ jaune claire. Parfois fins sillons courts et sinueux (voir figure II.12(a)). La brushite est rare à l'état pur et en tant que constituant majoritaire des calculs urinaires. Elle est fréquemment associée à l'apatite (voir figure II.12(b)) ou à l'oxalate de calcium dont elle peut constituer le noyau central ou une couche interne (voir figure II.12(c)).

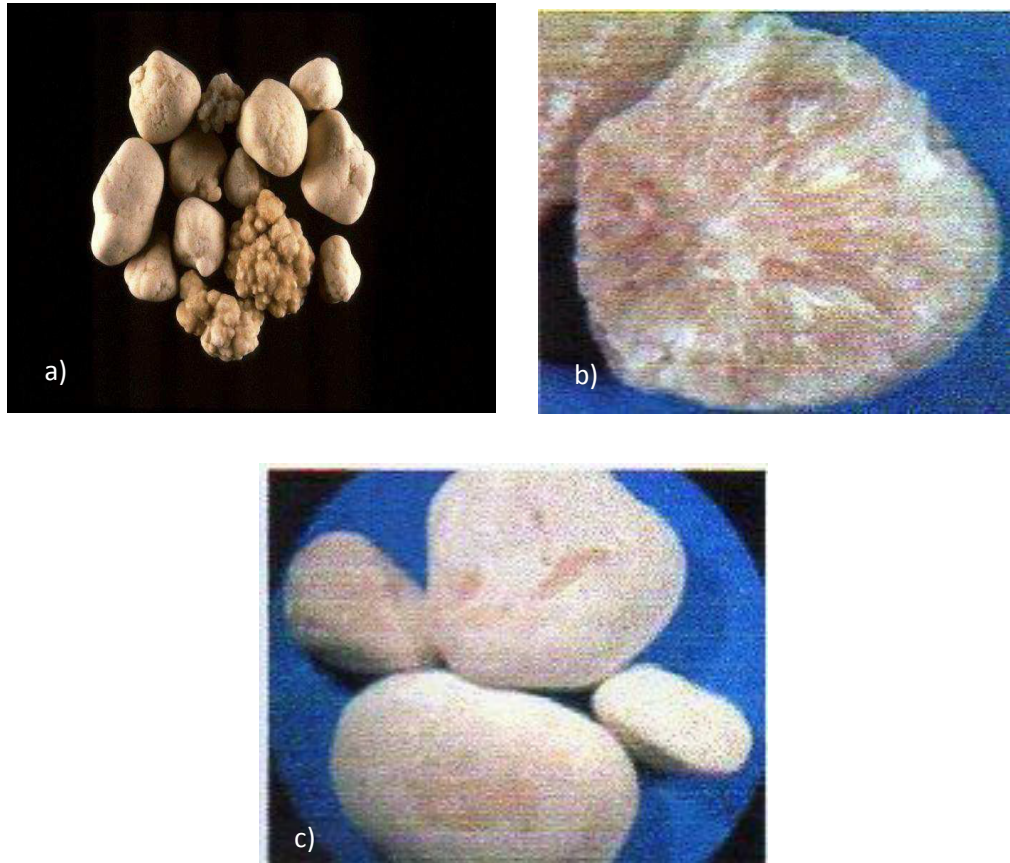


Figure II.12: Différents calculs de brushite. a): Calcul de brushite pure pommelée en chou-fleur; b): Calcul de brushite+ carbapatite ; c): Calcul de brushite + weddellite (Daudon et al, 2012)

La brushite est une espèce cristalline particulière non seulement par son caractère très récidivant mais aussi par la dureté des calculs qu'elle compose qui sont, de ce fait, plus résistants que les autres à la fragmentation par les lithotriteurs (les calculs de brushite sont connus pour leur résistance relative aux ondes de choc extracorporelles).

1.4 Cristallisation de la struvite

1.4.1 Identification par microscopie optique à polarisation

La struvite ou phosphate ammoniaco-magnésien hexahydraté (PAM ou STR) est une substance cristalline, composée de magnésium, ammonium et phosphate dans des concentrations molaires égales ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La struvite cristallise dans le système orthorhombique. Cette espèce cristalline cristallise en urine alcaline et forme des cristaux de grandes tailles pouvant se présenter sous différents faciès.

Les cristaux de struvite sont typiquement incolores, rectangulaires polarisants en forme de couvercle de cercueil, de taille variable (voir figure II.13(a)). Agrégat de cristaux de struvite en baguette dont certaines extrémités sont pointues et asymétriques (voir figure II.13(b)). Les cristaux cruciformes de struvite aux contours irréguliers s'observent préférentiellement dans les urines où la sursaturation en struvite est très élevée (voir figure II.13(c)).

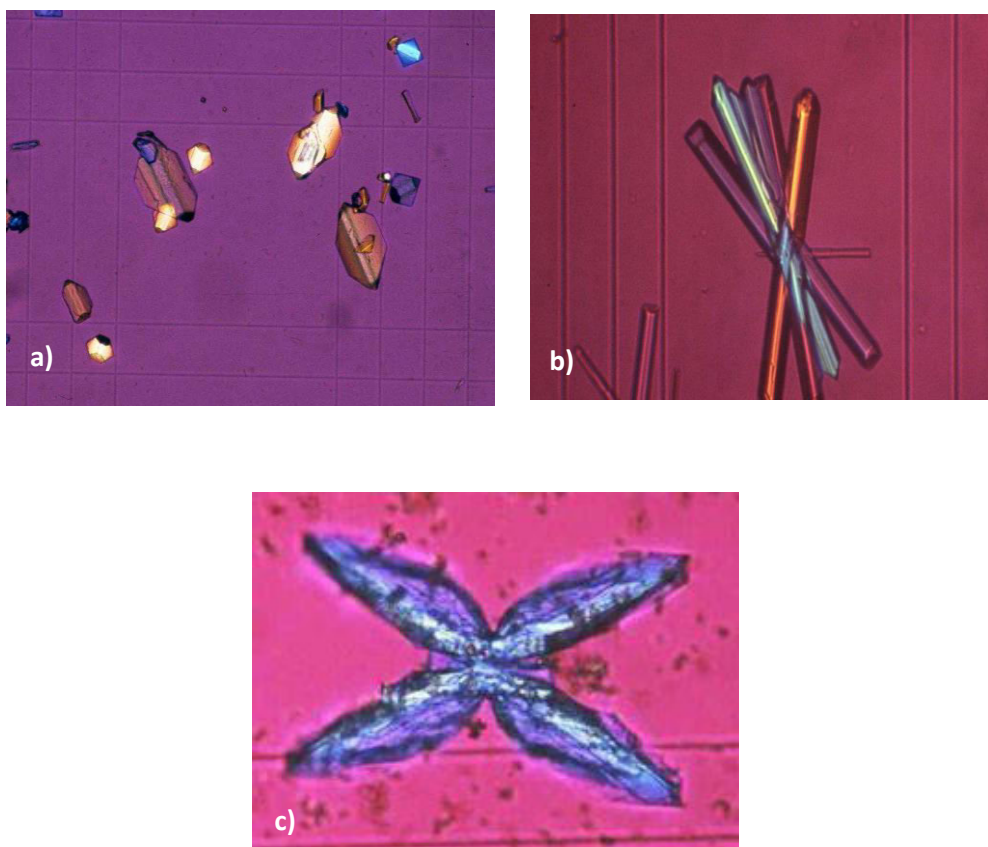


Figure II.13: Cristaux de struvite vue en microscopie optique. a) : cristaux de struvite ; b) : agrégat de cristaux de struvite en gerbe ; c) : cristal cruciforme de struvite (branche non orthogonale) rare (Daudon et al, 2012 ; Daudon, 2003).

La struvite est une espèce minérale particulière puisqu'elle nécessite contrairement aux oxalates et aux phosphates de calcium un ensemble de conditions de cristallisation qui ne sont habituellement pas réunies dans l'urine normale, à savoir un pH urinaire et /ou un produit molaire $(Mg)(NH_4)(PO_4)$ et /ou une concentration en ammoniacque élevée. Les urines des sujets normaux sont généralement sous-saturées en struvite.

II.4.2 Identification par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Le spectre infrarouge illustré dans la figure II.14 montre les principales fréquences de vibrations de la struvite. Les pics spectrales caractéristiques de la struvite observées dans le spectre (voir figure II.14) sont : une bande de valence de phosphate à 1005 cm^{-1} , légèrement arrondie, concave à gauche ; bande de déformation d'ion ammonium à 1436 cm^{-1} ; plateau molécules d'eau + ion ammonium décrochant à 2350 cm^{-1} .

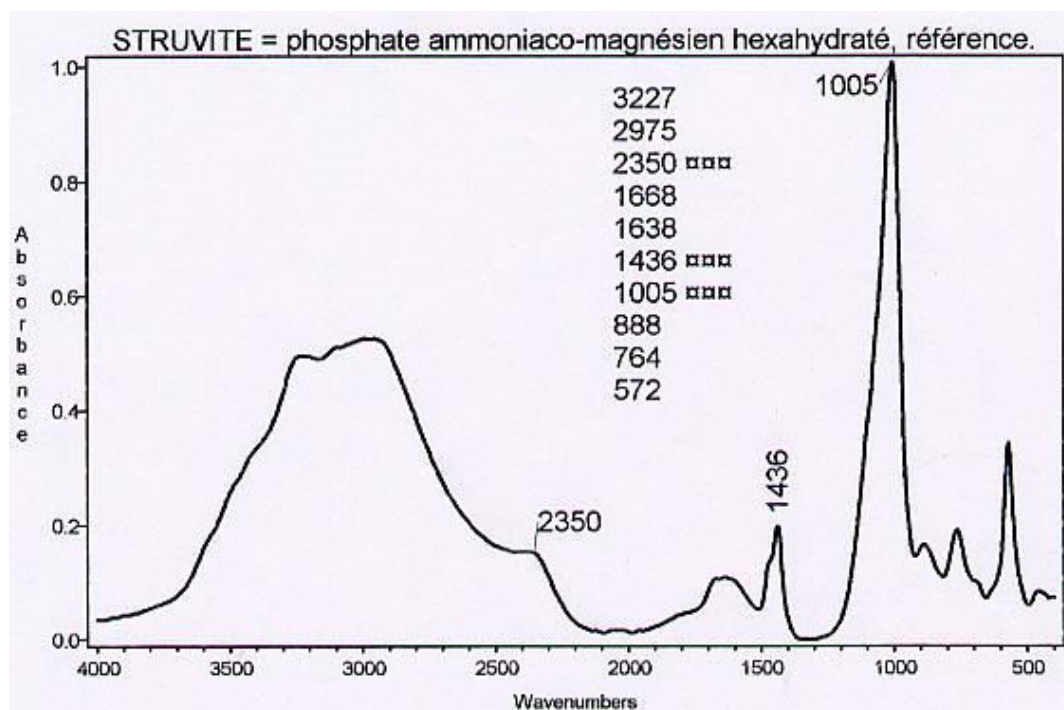


Figure II.14: Spectre IRTF de référence de la struvite (Fellahi, 2011 ; Daudon et al, 2012)

I.2.3 Calcul urinaire de struvite

Ce type de lithiase constitué de struvite, possède une surface pseudo-spéculée, blanche ou beige, faite de cristaux non quadratiques enchevêtrés (voir figure II.15).



Figure II.15: Calcul de struvite (Daudon, 2007)


Le phosphate ammoniaco-magnésien hexahydraté (struvite), est une espèce particulière par son lien étiologique extrêmement fort avec les micro-organismes uréasiques qui peuvent décomposer l'urée urinaire en ammoniac et en gaz carbonique. En présence d'eau, il se forme des ions ammonium qui alcalinisent l'urine et des ions bicarbonate qui vont contribuer à la carbonation des phosphates calciques. Ce contexte entraîne une sursaturation en struvite et une précipitation de phosphates calciques fortement carbonatés, notamment de la carbapatite, du fait du pH alcalin et de la production d'ions carbonates, en présence d'ions phosphates et calcium (voir figure II.16).



Figure II.16: Calcul majoritaire en struvite + carbapatite

Lorsque l'uraturie est élevée, l'augmentation de l'ammoniurie favorise la coprécipitation de l'urate d'ammonium.

En raison du processus cristallogène responsable de sa formation, la struvite est souvent accompagnée par d'autres espèces comme le phosphate amorphe de calcium carbonaté, carbapatite ou l'urate d'ammonium, d'où la présence simultanée de plusieurs phosphates dans les calculs induits par une infection de ce type.



*Chapitre III :
Description botanique des plantes
médicinales recommandées dans la
lithiase urinaire phosphatique et
phytothérapie*

Introduction

Le recours aux plantes médicinales, pour se soigner, a pris naissance depuis bien longtemps en médecine traditionnelle grecque, romaine, indienne, chinoise et arabomusulmane. Au cours des décennies passées, l'intérêt public pour les thérapies naturelles a considérablement augmenté dans les pays industrialisés, en même temps que l'utilisation des plantes médicinales et des médicaments à base de plantes.

En effet, 25% des médicaments modernes sont préparés à base de plantes qui ont, au départ, été utilisées traditionnellement (OMS, 2003). De nombreuses formes médicamenteuses à base des plantes ou de substances végétales ne cessent de croître à l'échelle mondiale (Wichtl et Anton, 2003). Cependant, les connaissances scientifiques sur l'usage de ces plantes sont encore très limitées.

En Algérie, la médecine douce est encore largement sollicitée chez la population qui semble être plus sensible aux traditions et aux croyances. La pharmacopée traditionnelle algérienne est riche et diversifiée à l'image de la diversification de la flore algérienne et le traitement par les plantes fait partie de notre patrimoine culturel et se transmet de génération en génération (Bensekrane et al , 2015 ; Djaroud et al, 2013 ; Amar et al, 2010) . Dans ce chapitre, un état de connaissance sur la phytothérapie et les plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase urinaire, sera présenté en premier lieu. Un portrait exhaustif des plantes médicinales utilisées en Algérie pour le traitement de ce type de pathologie, sera dressé. Nous présenterons aussi les travaux antérieurs sur l'action des plantes dans le traitement de la lithiase phosphatique.

I La phytothérapie

Etymologiquement, le terme phytothérapie provient de deux mots du grec ancien phyto (plante) et thérapie (soigner) (Pierre Claver, 1993).

La phytothérapie est une médecine douce qui utilise les principes actifs contenus dans les plantes médicinales et qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, elle est souvent associée aux traitements classiques. Aujourd'hui, encore une majorité de la population mondiale plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de

plantes. Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments. Les plantes médicinales et les médicaments d'origine végétales passent dans l'esprit de nos populations pour être efficaces et bien tolérés parce que naturel et faisant partie de la médecine « douce ». De nos jours, entre 20000 et 25000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine, 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (**Ben Karrich, 2012**).

1.1 Les avantages de la phytothérapie

Les tradipraticiens et les herboristes ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales et ont pu réussir à sélectionner des plantes actives, malgré la biodiversité d'espèces végétales qui les entouraient, avec une similitude de l'usage et des indications de ces plantes chez des populations qui n'ont eu aucun échange culturel (**Amar et al, 2010**). Ainsi, l'homme a entretenu d'étroits rapports avec le monde végétal et a utilisé les plantes médicinales pour se soigner. Cet engouement pour les plantes médicinales dans le traitement de la lithiase, peut s'expliquer par le coût élevé des médicaments conventionnels et/ou de la prise en charge de la lithotritie extracorporelle (LEC) et l'urétéroscopie (URS), le faible pouvoir d'achat en particulier chez les populations dans les pays en développement, ainsi que l'échec relatif à la médecine moderne devant certaines maladies, la méfiance vis-à-vis des produits de synthèse et de leur toxicité, les effets secondaires de l'ingestion des médicaments conventionnels, l'envie de consommer Bio et les croyances ethniques (**Larrey D, 1997 ; Schuppan et al, 1999; Stedman, 2002; Pageaux et Larrey D, 2003; Peyren Biroulet et al, 2004**).

1.2 Les inconvénients de la phytothérapie

L'usage des plantes médicinales en phytothérapie nécessite d'être vigilant car elles comportent aussi de nombreux inconvénients, ce qui limite leur efficacité. Les plantes médicinales doivent être employées avec précaution sur avis de tradipraticiens ou herboristes car certaines sont toxiques, dans certaines conditions d'utilisation. A

titre d'exemple l'éphédra (*Ephedra sinica*), mal dosée, est très toxique et l'absinthe *Artemisia absinthium* possède des substances actives dangereuses, son utilisation doit être limitée (**Djaroud, 2013**). La durée du traitement en phytothérapie ne doit pas être prolongée et le patient doit être attentif au choix de la plante et doit respecter la posologie du traitement. Aussi, il semblerait que plus la durée de stockage est grande, plus les vertus des plantes diminuent : elles deviennent alors moins efficaces.

II Les plantes médicinales

II.1 Définition d'une plante médicinale

Il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. La pluparts des espèces végétales qui poussent dans le monde possèdent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. Elles présentent en effet, des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**). De tout temps, les plantes médicinales ont été utilisées en médecine traditionnelle dans le but de soulager les patients qui ont une maladie douloureuse comme la lithiase urinaire. Les tradipraticiens et les herboristes ont pu réussir à sélectionner des plantes aussi actives, malgré la biodiversité d'espèces végétales qui les entouraient, avec une similitude de l'usage et des indications de ces plantes.

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour le découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

II.2 Efficacité de la plante entière « totum »

Les plantes médicinales font appel à des formes galéniques diverses : plante en nature, poudres, gélules de poudre, extraits, teintures, huiles essentielles (**Vigneau, 1985**).

S'il est capital de maîtriser l'action des différents principes actifs pris isolément, la phytothérapie, à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi « totum » plutôt que des extraits obtenus en laboratoire (**Iserin, 2001 ; Fleurentin, 1991 ; Larousse, 2001**). Les principes actifs de nombreux

végétaux, agissent de manière complexe et combinée pour produire un effet thérapeutique global (Larousse, 2001).

Cependant, les plantes contiennent une grande variété de composés secondaires, et il convient de se demander aussi si elles peuvent être néfastes. Certains de ces composés, au moins à l'état pur et à certaines doses, peuvent être bénéfiques ou toxiques. Toutefois, il ne s'ensuit pas nécessairement que les mêmes composés sont aussi toxiques ou bénéfiques lorsqu'ils se trouvent dans la plante que lorsqu'ils sont extraits (Cardon et Chatenet, 1990).

II.3 Les formes d'utilisation des plantes

L'utilisation des plantes médicinales est encore une des formes de médecine la plus répandue à travers le monde. Elles représentent la seule source de médicaments pour près de 90% de la population de certains pays d'Afrique.

Les extractions de différents produits se font sous différentes formes dont les plus importantes sont : les tisanes, la gélule de la plante, les suspensions de plantes fraîches, les teintures mères, les macéras glycinés et les huiles essentielles. Les méthodes les plus répandues sont au nombre de trois : l'infusion, la décoction et la macération (Isperin, 2001 ; Debuigne et Couplan, 2006).

Dans les différents remèdes, l'objectif est de préserver le plus possible l'intégralité de la plante et de ses composants pour un maximum d'efficacité.

II.3.1 L'infusion :

L'infusion est le mode de préparation qui s'applique aux organes délicats de la plante (feuilles, sommités fleuries et fleurs). Ce mode de préparation préserve les principes actifs de la plante. Cette forme de préparation est la plus utilisée par les patients, elle est employée avec des plantes fraîches mais généralement avec les sèches.

L'infusion peut être préparée en versant de l'eau bouillante sur la plante dans un récipient fermé. Après 10 à 15mn, l'infusion est obtenue après un simple filtrage de la solution.

II.3.2 La décoction

Pour les organes durs et compacts (bois, écorces, tiges et racines) qui ne délivrent leurs principes actifs que sous l'action prolongée de la chaleur, la décoction est le mode de préparation bénéfique afin d'extraire une quantité maximale de principes actifs.

Ce mode de préparation diffère du précédent par le fait que la préparation est maintenue en ébullition pendant quelques temps, la plante est mise dans de l'eau froide portée à ébullition.

II.3.3 La macération

Dans cette méthode de préparation, la plante est trempée dans de l'eau froide, de l'alcool ou de l'huile. Le temps de macération varie de quelques heures à quelques jours, tous dépend de la plante et du principe actif à extraire. La macération est une préparation liquide à froid, elle est utilisée pour garder les principes actifs des plantes médicinales intacts. Elle est recommandée pour les principes actifs délicats et sensibles à des températures élevées.

III Les composants actifs d'une plante médicinale

Les principes actifs des plantes médicinales sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti inflammatoires, diurétiques, antioxydant (**Harbone et Baxter, 1993 ; Bruneton J, 1999**).

Ces principes actifs appartiennent à trois classes principales : composés aromatiques (phénoliques ou dérivé d'acétate), terpenoïdes et stéroïdes, composés azotés ou alcaloïdes.

III.1 Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présents dans tous les végétaux. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, ester, sucre...). Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. Ces substances sont

dotées de certaines activités thérapeutiques comme : antioxydant, anti inflammatoire, antibactérienne, antifongique...(**Larousse, 2001**).

Les composés phénoliques peuvent être divisés en une dizaines de classes chimiques, peuvent s'étendre de molécules simples, telles que les acides phénoliques (acide salicylique), aux composés fortement polymérisés, tels que des tanins (**Lugasi et al., 2003**).

III.1.1 Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre des plantes agricoles et médicinales. Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets antioxydant et anti-inflammatoire. Pharmacologiquement, les mieux caractérisés sont l'acide salicylique et l'acide caféique.

III.1.2 Les tanins :

Les tanins sont des substances d'origine organique que l'on trouve dans pratiquement tous les végétaux et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles et les fruits) (**Hemingway RW, 1992**). Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (**Berthod et al, 1999**). Ils sont divisés en deux groupes :

- tanins hydrolysables (esters des acides phénols et de glucose)
- tanins condensés (flavan-3-ols) appelés aussi polyphénols.

Ces composés présentent des propriétés antioxydantes significatives, ils ont la propriété de précipiter les protéines et les métaux lourds, ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides (**Kansole M.R, 2009**).

III.1.3 Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs, la protection des plantes contre les radiations UV et leur défense contre les herbivores et les attaques microbiennes (**Harborne et al, 2000**). De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des

activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydantes et anticancéreuses (**Meddleton et Kardasnani, 1993 ; Larousse, 2001**).

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**Medic et al, 2004**).

III.2 Les alcaloïdes :

Un alcaloïde est un composé organique naturel issu principalement des végétaux, hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe (**Zenk et Juenger, 2007**). Les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogènes, solubles dans l'eau. La présence d'au moins un atome d'azote qui accepte souvent un proton, leur confère un caractère légèrement basique en solution (d'où leur nom d'alcaloïdes). Les alcaloïdes purs, extraits de plantes ou leurs dérivés de synthèse, possèdent une remarquable activité physiologique qu'a conduite à l'emploi de certains d'entre eux en thérapeutique (morphine, quinine, cocaïne, etc) (**Hopkins et Evrard, 2003**). Ils comptent parmi les agents médicinaux de base dans le monde entier connus pour leur effets analgésiques, antispasmodiques, bactéricides, ils donnent à la fois des drogues et des médicaments.

III.3 Les terpenoïdes :

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques. La famille des terpenoïdes comprend (**Hopkins et Evrard, 2003**) :

- Des pigments caroténoïdes (carotène)
- Des stérols (par exemple : cholestérol, ergostérol)
- Des hormones
- Une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leurs parfums ou leur goût.

III.3.1 Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée, mais six d'entre eux

sont majoritaires : le β -carotène, le lycopène, la luteine, la β -cryptoxanthine, l' α -carotène et la zéaxanthine (**Roch, 2003**). Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet. Cette chaîne polyène, par mécanisme d'addition, permet l'incorporation des espèces réactives ou radicaux libres et de ce fait ralentir leur propagation. Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants, ils sont impliqués dans la prévention de nombreux types de cancer (**Hale, 2003**).

III.3.2 Les saponines :

On désigne sous ce nom une vaste famille de glycosides triterpéniques ou stéroïdiens qui se trouvent dans de nombreuses plantes. Les saponines ont des propriétés tensioactives, font mousser leurs solutions et servent de détergent. On trouve les saponines dans le soja, l'ail, les épinards, les tomates...etc.

Les stéroïdes présents naturellement dans les plantes à saponines sont similaires avec les hormones stéroïdes naturelles de l'homme. C'est pourquoi des plantes contenant des saponines stéroïdes ont une certaine activité hormonale.

III.3.3 Les huiles essentielles :

L'aromathérapie est une pratique qui consiste à utiliser les huiles essentielles extraites des plantes pour se soigner. Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques de plantes qui sont extraites par distillation. Ce sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux. Ils comptent parmi les composants actifs les plus importants des plantes, ils ont un effet antiseptique ou anti-inflammatoire.

III.4 Les vitamines :

Les vitamines sont des composés organiques à des structures chimiques très variées. La plupart des plantes médicinales contiennent des plusieurs vitamines en quantité plus ou moins grande. Certaines plantes sont particulièrement riches. La vitamine E, l'une des vitamines les plus connues présente dans les plantes est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de

vieillesse (Maydani, 2000). Elle est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les diverses graines (Vansant, 2004). La vitamine C est un puissant réducteur, il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. on la trouve dans un grand nombre de plantes et en particulier dans les fruits tels que les kiwis, les agrumes de façon générale (citron, mandarine, orange, pamplemousse...etc).

L'action des vitamines que l'on peut consommer a des effets nombreux et bien connus sur la santé humaine.

III.5 Les amers :

Les amers sont des composants organiques présents dans plusieurs plantes. On les trouve dans les plantes qui ont une amertume du goût ou d'odeur. Ces composés ont plusieurs effets sur les organes digestifs, en augmentant l'appétit et en améliorant la digestion.

III.6 Les minéraux :

Les minéraux sont présents dans la plupart des plantes sous forme des sels solubles dans l'eau. La composition minérale diffère d'une plante à une autre, certaines plantes contiennent de grandes quantités de sels minéraux. Généralement, les composés minéraux souvent présents dans les plantes sont : le potassium (K), le phosphore (P), le sodium (Na), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le manganèse (Mn), le fer (Fe)....etc. Les vertus thérapeutiques associées à la présence de ces composés diffèrent d'une substance à une autre, on note globalement les effets : digestives, tonifiantes, nutritifs, stimulante....etc.

IV. Description botanique des plantes utilisées dans le traitement de la lithiase phosphatique

IV.1 Phoenix dactylifera L (datte)



Figure III.1 : Phoenix dactylifera L (les dattes)

Règne : Plantae
Sous règne : Spadicifloies
Division : Magnoloiphyta
Classe : liliopsida
Sous classe : Coryphoïdées
Ordre : Arecales
Famille : Arécacées
Genre : Phoenix
Nom binominale : Phoenix dactylifera L
Noms vernaculaires : Datte

Description botanique :

Le palmier dattier « Phoenix dactylifera L » provient du mot « Phoenix » qui signifie dattier chez les phéniciens, et « dactylifera » dérivé du terme grec « dactulos » signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit. La datte est le fruit du palmier dattier, elle est constituée de deux parties : comestible (pulpe ou chair) et non comestible (noyau). Les dimensions de la datte sont très variables, 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 gr selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouge, brune plus au moins foncée. Les dattes sont généralement de forme allongée, oblongue ou ovoïde, mais rencontre

également des dattes sphériques. Le palmier dattier commence à produire les fruits à un âge moyen de cinq années, et continue la production pour plus de 60 ans.

Habitat :

C'est une espèce arborescente connue pour son adaptation aux conditions climatiques trop sévères des régions chaudes et sèches. Il est répandu dans toutes les zones chaudes d'Afrique du nord, le Sahara, depuis l'Atlantique jusqu'à la mer rouge. Il a été introduit dans les cinq continents, en particulier en Amérique et en Australie.

Propriétés thérapeutiques

La richesse des noyaux des dattes en composés phénoliques lui confère des vertus antioxydantes. La datte est connue pour son effet calmant grâce à sa contenance en minéraux et surtout le magnésium. Les dattes sont des fortifiants pour les femmes après l'accouchement, elles régularisent l'hyper tension artérielle. Elles sont souvent utilisées dans les régimes alimentaires pour lutter contre l'obésité. En médecine douce, elles sont employées contre la toux et les angines.

Principaux constituants :

La richesse de datte en élément minéraux la classe parmi les éléments les plus intéressants. Elle est riche en potassium, calcium et magnésium. Elle contient une portion importante de sucre.

Les noyaux des dattes sont caractérisés par une richesse en fibres, en protéine et en huile à haute valeur ajoutée.

IV.2 Le *Trigonella foenum* (le fenugrec)



Figure III.2 : *Trigonella foenum* (le fenugrec)

Règne : Plantae

Sous règne : Trachebionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Trigonella*

Nom binominal : *Trigonella foenum-graecum*

Noms vernaculaires : Holba, helba, el helba

Description botanique :

Le fenugrec est une plante herbacée annuelle, peut atteindre 50cm de haut, à tige dressée. Les fleurs sont jaune pâles à violet clair de forme triangulaire. Le fruit est une gousse allongée pouvant atteindre 20cm de long et renferment de nombreuses graines (10 à 20), très dures, mesurant 3 à 5mm de long et 2 à 3mm de large, de couleur brun clair, à forte odeur caractéristique.

Habitat :

Elle affectionne les climats doux et peu pluvieux. Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) est une plante très largement cultivée dans le Bassin méditerranéen, en Inde et en Chine. Elle pousse spontanément dans les oasis, elle est cultivée en Algérie.

Propriétés thérapeutiques :

Cette graine compte parmi les plus anciennes plantes médicinales et culinaires de l'histoire de l'humanité. Parmi les indications thérapeutiques démontrées et ses bienfaits reconnus, le fenugrec s'avère particulièrement efficace contre de pertes d'appétit, dans le rétablissement du bon fonctionnement du système digestif et même dans la prévention de certains cancers (pancréas notamment). Traditionnellement, le fenugrec est utilisé pour soulager les troubles digestifs et respiratoires, et redonner de l'énergie aux convalescents et aux personnes déprimées. Dans le contexte des compléments alimentaires, le fenugrec est proposé pour aider à contrôler la glycémie (taux de sucre dans le sang) chez les personnes diabétiques et le taux de cholestérol sanguin chez ceux qui souffrent d'un excès de cholestérol. Le fenugrec stimule la production du lait maternel tout en l'enrichissant de ses huiles essentielles qui diminueront les coliques et les gaz chez le nourrisson.

Encore plus étonnant, moulues afin d'obtenir une pâte puis massées sur le cuir chevelu, les graines de fenugrec seraient un remède naturel et efficace pour lutter contre la calvitie, la perte ou la chute de cheveux. En plus de ses propriétés apéritives (ouvrant l'appétit), digestives et tonifiantes, on attribuait au fenugrec le pouvoir de combattre les infections et inflammations des voies respiratoires, de faciliter l'accouchement et la lactation, de soigner les blessures cutanées, les douleurs rhumatismales, etc.

L'innocuité et l'efficacité de l'extrait de *trigonella foenum* ont fait l'objet d'une étude faite par Abdel-Barry et al (**Abdel-Barry et al, 2000**). L'extrait aqueux de cette plante à 40gr/l a réduit efficacement et sans risque la glycémie chez les sujets normaux.

Les propriétés anti-oxydantes et anti-leucémiques des graines de fenugrec ont été confirmées par des expériences préliminaires effectuées par les chercheurs Acharya et al (Acharya et al, 2011).

Principaux constituants :

Le fenugrec est une plante à grande valeur alimentaire au regard de sa richesse nutritionnelle due à ses multiples constituants biochimiques. En effet, le fenugrec se compose de plus de 30 % de protéines, 20 % de glucides, 10 % de lipides et 40 % de fibres mucilagineuses. Il est également riche en sels minéraux à savoir le phosphore, le fer, le calcium, le soufre, le magnésium, etc.

De même, plusieurs autres composants que sont l'acide nicotinique, les alcaloïdes, les saponines notamment les saponines stéroïdiques (yamogénine, diosgénine), les flavonoïdes, les vitamines A, B1, C, la lécithine, les galactomannanes, les huiles essentielles et une quantité infime de résine sont à la base de la richesse de cette plante. Le fenugrec est une épice riche en phosphore et en fer, en magnésium, calcium, fibres, potassium et en vitamines (B6, C), c'est un allié santé indiscutable au quotidien.

IV.3 Le *Cerasus vulgaris* (le cerisier)



Figure III.3 : *Cerasus vulgaris* (cerise)

Règne : Plantae
Sous règne : Trachebionta
Division : Spermatophyta
Classe : Angiospermae
Sous classe : Dicotyledonae
Ordre : Rosales
Famille : Rosaceae
Genre : Prunus
Nom binomiale : Prunus cerasus , cerasus vulgaris
Noms vernaculaires : Hab el m'louk

Description botanique :

C'est un arbre fruitier d'une hauteur de 6 à 10 mètres, ses feuilles de couleur vert foncé, dentelées. Les fleurs blanches très odorantes, sont groupées en bouquet. Le fruit est une drupe charnue sphérique rouge plus au moins foncé. La longueur moyenne des pédoncules de cerise est de 4 cm, leur couleur est brunâtre et leur saveur est amère.

Habitat :

Le cerisier est cultivé dans de nombreux pays, mais principalement en Turquie, aux Etats Unis, en Iran, en Italie, en Russie, en Syrie, en Espagne, en Romaine et en Grèce.

Propriétés thérapeutiques :

La cerise est un fruit très intéressant car les tiges, les feuilles, les fleurs et même l'écorce d'arbre sont très utiles en médecine naturelle. Puisqu'elle ne contient pas beaucoup de calories, la cerise est souvent utilisée pour la perte de poids. Elle augmente également la résistance de l'organisme aux maladies en renforçant le système immunitaire.

La queue de cerise est la partie la plus bénéfique de ce fruit formidable. Elle aide à perdre du poids et garder la forme et elle est bonne pour traiter certains problèmes de santé comme la goutte, les infections des reins, la bronchite et beaucoup d'autres encore. Les queues de cerises vont nous permettre de faire une cure de désintoxication très efficace en infusion et excellent pour le traitement des infections des voies urinaires et /ou des ballonnements. Ses vertus diurétiques est nettoyantes en font une très bonne option pour les personnes atteintes de cystites, d'infection urinaires ou qui ont des problèmes de reins. Les queues de cerises ont aussi des propriétés laxatives, dépuratives qui sont utiles pour la lutte contre l'anémie, la cellulite, la constipation, la

grippe et les rhumatismes. Elles renforcent par ailleurs les nerfs, tout en ayant un effet calmant.

Un régime riche en cerises permettrait également de diminuer le risque de développement des tumeurs de l'intestin (**Khan et al, 2003**). Les cerises apporteraient en plus une protection cardiovasculaire en diminuant les marqueurs anti-inflammatoires de façon significative (**Kelley et al, 2006**).

Traditionnellement, les pédoncules sont utilisés pour améliorer et régulariser le cycle veille-sommeil chez les individus humains présentant des troubles du sommeil (**Howatson et al, 2012**) en raison de sa teneur en mélatonine. Des recherches récentes ont révélé plusieurs propriétés médicales de queues de cerise tel que anti-inflammatoire (**Haddad et al, 2013**) et antimicrobiennes (**Hanbali et al, 2013**).

Principaux constituants : flavonoïdes, sel de potassium, tanins et vitamines

Les fruits cerises contiennent plusieurs vitamines tel que les vitamines B₁, B₂, B₃, B₆, A et vitamine C. Elles sont également riche en sels minéraux à savoir le phosphore (P), le fer (Fe), le calcium (Ca), le sodium (Na), le magnésium (Mg), le potassium (K) et des différents protéines. Les queues de cerises sont quant à elles très riches en flavonoïdes, ainsi qu'en mucilages et en tanins, tous ces composés sont des principes actifs bien connus pour ditoxifier le corps grâce à leur action diurétique.

IV.4 Malus Pumila (la pomme)



Figure III.4 : Malus pumila (la pomme)

Règne : Plantae
Sous règne : Trachebionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous classe : Rosidae
Ordre : Rosales
Famille : Rosaceae
Genre : Malus
Nom binominale : Malus pumila
Noms vernaculaires : la pomme

Description botanique :

La pomme est un fruit qui pousse dans le pommier qui est l'un des plus anciens arbres fruitiers et sans doute le plus répandu sur la planète!. Le nom «pomme» nous vient d'ailleurs du latin « pomum » qui signifie «fruit».

La chair des pommes est plus ou moins ferme, croquante, sucrée ou acidulée selon l'espèce. Ce fruit, généralement sphérique, compte de multiples variétés aux couleurs de peau très variées : verte, jaune, rouge ou panachée.

Habitat :

La pomme fait partie des fruits les plus cultivés dans le monde. En France, les surfaces cultivées dépassent les 600 000 hectares, principalement en Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées et Aquitaine.

Propriétés thérapeutiques :

La pomme est un fruit modérément calorique car elle ne contient en moyenne que 80 calories. Elle est ainsi le coupe-faim idéal dans le cadre d'une alimentation saine.

La pomme contient une grande variété d'antioxydants qui permettent de prévenir les cancers, en particulier le cancer du poumon, ainsi que les maladies cardiovasculaires. Pour profiter de cet atout de la pomme, il est préférable de la consommer avec sa peau, qui possède davantage de pouvoir antioxydant que sa chair.

Des études ont par ailleurs démontré qu'une consommation régulière de pomme pouvait avoir des effets positifs sur les fonctions respiratoires et ainsi prévenir l'asthme. Elle permet de diminuer le cholestérol, notamment le mauvais cholestérol.

Il faut toutefois pour cela consommer deux ou trois pommes par jour. Sa richesse en fibre permet, même avec des quantités moindres, de réguler le transit intestinal. On lui prête, entre autres, des vertus diurétique, laxative, antirhumatismale et digestive. La pomme constitue un allié par excellence pour les dents car sa consistance stimule les gencives et débarrasse les dents des particules d'aliments.

Principaux constituants :

La pomme est riche en vitamines, notamment des vitamines du groupe B et E, ainsi que des vitamines C. Notez que la peau des pommes concentre davantage de vitamines C que sa chair. Elle contient par ailleurs 85 % d'eau, de multiples minéraux et oligo-éléments, en particulier du potassium. La pomme contient d'importantes quantités de fibres. La moitié de ces fibres sont solubles, en particulier de la pectine. Celle-ci, particulièrement présente dans la peau de la pomme.

IV.5 *Rubia tinctorum* (la garance)



Figure III.5 : *Rubia tinctorum* (la garance) (Ali fatahi, 2008)

Règne : Plantae

Sous règne : Spermatophyta (Angiospermae)

Division : Asténiées

Classe : Angiospermae

Sous classe : Dicotyledonae

Ordre : Gentianales

Famille : Rubiacées

Genre : *Rubia*

Nom binominal : *Rubia tinctorum*

Noms vernaculaires : la garance, la garance de teintures, rouge de teinturiers.

Description botanique :

La garance des teintures « *Rubia tinctorum* L » est une plante herbacée, vivace et grimpante à racines vivaces et à tiges annuelles, de la famille des Rubiacées. Les tiges droites à section carrée sont munies d'aiguillons crochus. Les feuilles sont lancéolées, groupées avec stipules en verticilles de quatre à six ensembles. Les fleurs très petites, blanc crème (couleur de miel), sont groupées en cymes à l'aisselle des feuilles au bout de la tige. Elles fleurissent en juillet. Les fruits sont de petites baies d'abord rouge, puis noires, lisses, brillantes et mûres en septembre. A l'automne la partie aérienne de

la plante meurt, seule la racine survit. Ces racines, la partie la plus riche en colorants, sont de section ronde, très ramifiées.

Habitat :

La garance est une plante commune en Europe du sud (Espagne, Italie, midi de la France), d'Asie occidentale et d'Afrique du nord. Elle pousse sur fridres, dans les haies et la rocaille.

Propriétés thérapeutiques :

La garance est traditionnellement utilisée dans l'insuffisance biliaires et les lithiases urinaires ainsi que pour faciliter les accouchements. La garance est utilisé en médecine, elle subit plusieurs activités pharmacologiques et biologiques, tel que : anti cancer, antimicrobien, antioxydant, anti inflammatoire (Park et al, 2009 ; Shanfzadeh et al, 2014 ; Alsarhan A, 2013). Elle est recommandée contre la jaunisse, l'anémie et les dartres. En fait, les principes actifs de la plante désintègrent ou peut être dissolvent les calculs urinaires, phosphatiques et magnésio-calciques dans les reins et la vessie. On considère maintenant cela douteux, les effets s'expliquant comme le résultat de la diminution des spasmes dans le système urinaire due à l'action du groupe entier de principes actifs, ce qui facilite l'élimination des calculs des voies urinaires. Sont également protestés les propriétés diurétiques de ces constituants qui, cependant sont éliminés dans l'urine et lui donnent sa coloration rouge (qui n'a rien à voire avec le sang) (Stary et al, 1992 ; Odounga Karen Flora, 2011). Les principes actifs anthraquinoniques comme l'alizarine, purpurine et l'acide rubérythrique présents dans les racines de *Rubia tinctorum* possèdent des propriétés thérapeutiques antibactériennes et antifongiques (Rath et al, 1995).

Principaux constituants :

La garance contient des différents dérivés d'anthraquinone (acide rubérythrique, alizarine et purpurine). Les racines de cette plante sont très riches en minéraux notamment le potassium (K), le sodium (Na), le magnésium (Mg) et le zinc (Zn). Elles contiennent également d'autres minéraux à faibles concentration comme l'azote (N), le

phosphore (P), et le calcium (Ca). Les racines de *Rubia tinctorum* sont riches en tanins, flavonoïdes, phénols, glycosides et d'huiles volatiles.

IV.6 L'Hordeum vulgare (l'orge)

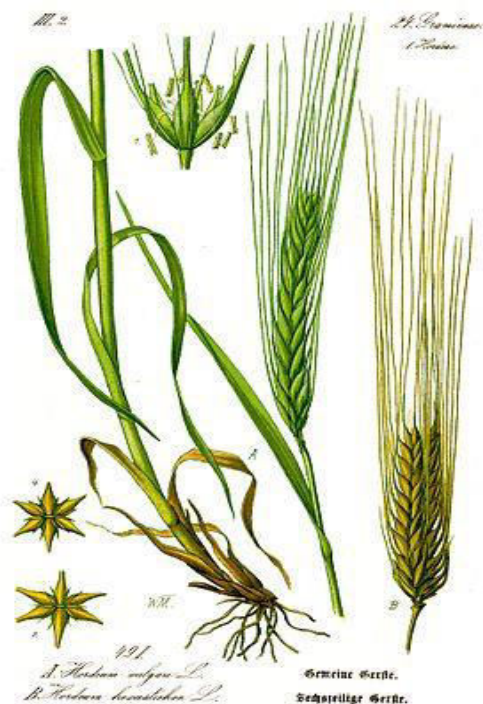


Figure III.6: Hordeum vulgare (l'orge)

Règne : Plantae
Division : magnoliophyta
Classe : liliopsida
Ordre : cyperales
Famille : poaceae
Genre : Hordeum
Nom binomiale : Hordeum vulgare
Noms vernaculaires : Zraae

Description botanique :

L'Hordeum vulgare (l'orge) est la plus ancienne céréale cultivée, c'est la quatrième importante céréale dans le monde après le blé, le riz et le maïs. L'orge est caractérisé par ses épis aux longues barbes ; épis plats à deux rangs de grains ou des épis cylindriques à six rangs de grains. Les grains arrondis et marqués d'un trait dans la longueur sont présentés « mondés » (complets) ou « perlés » (polis et raffinés)

Habitat : elle existe partout, mais originaire d'Asie.

Parties utilisées : les graines

Propriétés thérapeutiques :

Les graines d'Hordeum vulgare sont des graines très importantes utilisées dans la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète. Elles subissent une action favorable sur le taux de sucre dans le sang (elles réduisent l'hyperglycémie) (**Haleh et al, 2013 ; Gehan et Abdel-Gabbar, 2008**). Les extraits alcooliques d'Hordeum vulgare L ont été testées sur des rats normaux et des rats diabétiques, ces extraits ont suggéré un effet hypoglycémiques remarquable à long terme (**Minaiyan et al, 2014**). Cet effet est dû à la présence des fibres. Des études récentes sur les propriétés thérapeutiques de l'orge, ont démontré le potentiel effet antioxydant des extraits aqueux des graines d'Hordeum vulgare in vivo et in vitro (**Mary et al, 2013**). La consommation quotidienne d'au moins trois grammes de bêta-glucane (un type de fibre soluble contenu dans l'orge) permet de réduire le cholestérol, un facteur de risque de maladies cardiovasculaires (**Dalaney et al, 2003; Poppitt SD, 2007**). L'orge est réputée pour favoriser une bonne digestion (**Kanauchi et al, 2001**), et pour prévenir le cancer (il inhibait la nucléation des cellules cancérigènes) (**Lumen et Lunasin, 2005**).

Principaux constituants :

Parmi les grains céréaliers, l'orge fait figure de champion en matière nutritive. Cette céréale, cultivée depuis des millénaires, est riche en fibres, naturellement faible en gras et contient d'importants minéraux, vitamines et antioxydants. Elle contient : le sélénium, phosphore, fer, zinc, cuivre, manganèse, magnésium, vitamines du groupe B (B₁, B₂, B₃, B₆), protéines, glucides et lipides. Cette céréale est riche en acides aminés (acide aspartique, acide glutamique, proline et alanine).

V. Etudes antérieures sur le rôle des plantes médicinales dans le traitement des lithiases phosphocalciques

La phytothérapie suscite actuellement un renouveau d'intérêt s'appuyant sur des traditions millénaires de la médecine traditionnelle (**Larrey, 1997 ; Schuppan et al, 1999 ; Stedman, 2002 ; Pageaux et Larrey, 2003 ; Peyren et al, 2004**) et les potentialités thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales restent à découvrir et

doivent être justifiées par des preuves scientifiques indiscutables. C'est le cas des plantes médicinales recommandées dans le traitement des lithiases urinaires et dont les effets curatifs sont bien connus.

V.1 Les plantes inhibitrices de la struvite (phosphate ammoniac magnésien)

Une étude récente faite par Chauhan et al, afin de déterminer l'effet in vitro des extraits aqueux de la plante « *Rotula aquatica* » sur la cristallisation de la struvite, espèce lithogène, a montré que le nombre, la dimension et la croissance des cristaux de struvite diminuent lorsque les concentrations des extraits des plantes dans la solution augmentent (**Chauhan, 2011**).

Ces propriétés indiquent le potentiel effet inhibiteur de l'extrait de la plante « *Rotula aquatica* » sur la formation des calculs de struvite.

La plante « *Terminalia arjuna* » a un grand effet inhibiteur sur la formation des cristaux de phosphate de calcium et l'oxalate de calcium (**Chaudhary, 2010**).

Les extraits aqueux et alcooliques des fleurs de « *Jasminum auriculatum* » ont un effet remarquable sur les cristaux de struvite.

Ces extraits donnent une efficacité notable in vitro sur la dissolution des calculs de struvite (**Yogendr, 2009**). Le jus de « *Citrus medica Linn* » et l'extrait aqueux de « *Commiphora wightii* » ont une efficace propriété solvant sur la dissolution in vitro des calculs de phosphate de calcium (struvite) (**Chauhan, 2008a ; 2008b**).

La plante « *Boerhaavia diffusa* » joue un rôle important dans le processus de dissolution des calculs phosphatiques (les calculs de phosphate de calcium ammoniac-magnésien) (**Chauhan, 2009**).

Les solutions aqueuses obtenues par infusion de la plante *Acacia Radiana* dans l'eau bouillante à différentes concentrations ont été testées par Beghalia et al (2014), sur la cristallisation des phosphates ammoniac-magnésiens. Ces extraits ont exercé un effet inhibiteur important sur les trois phases de cristallisation in vitro : la nucléation, la croissance et l'agrégation des cristaux de struvite (**Beghalia et al, 2014**).

V.2 Les plantes inhibitrices de la Brushite

Les deux plantes « *Tribulus terrestris* » et « *Bergenia ligulata* » sont parmi les plantes utilisées dans la culture indienne pour traiter et prévenir les calculs de phosphates de

calcium notamment les calculs de Brushite. Les extraits de ces deux plantes ont un effet remarquable sur le temps de précipitation de la Brushite et le nombre de cristaux de phosphate de calcium. La longueur maximale des cristaux de Brushite est réduite ; c'est due au l'effet inhibiteur produit par les extraits des plantes (**Joshi, 2005**).

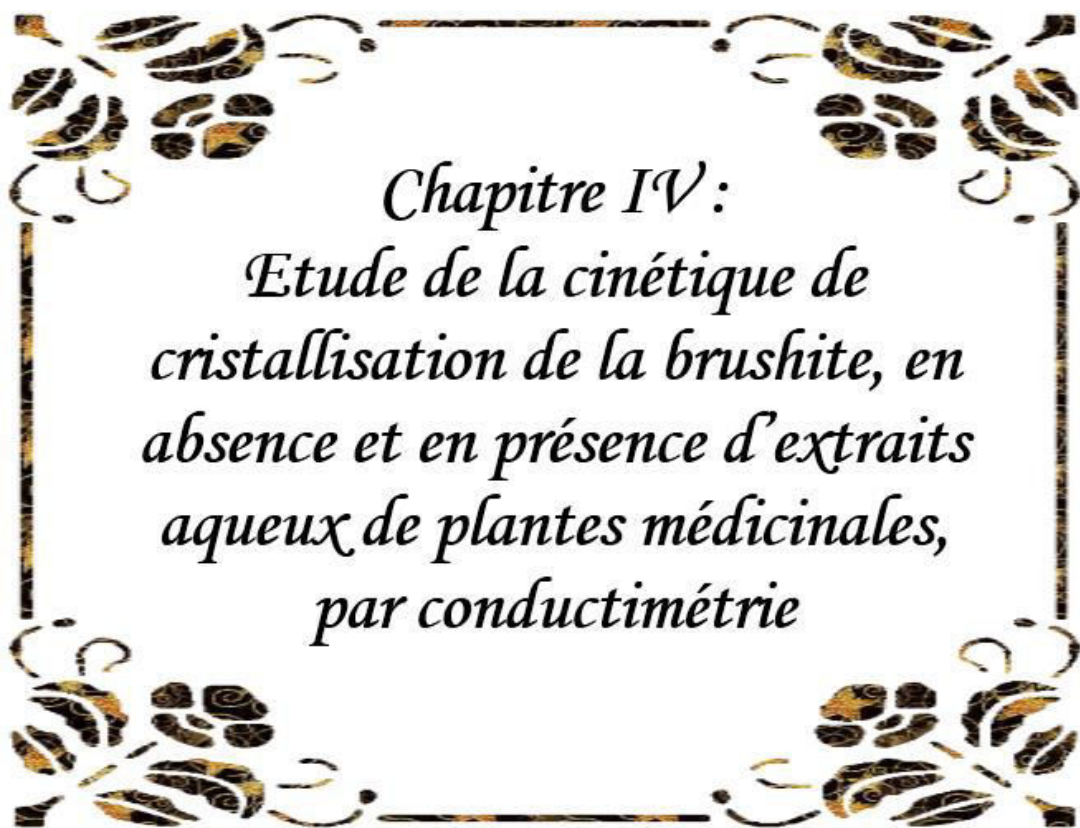
Le « *thé vert* » qui occupe déjà le premier rang des boissons consommés par les populations mondiales est appelé à connaître un rôle moteur dans les systèmes de santé publiques pour diverses pathologies. Le « *thé vert* » à des effets remarquables sur la nucléation, la taille des cristaux et l'agrégation cristalline des phosphates de calcium (Brushite). Il joue un rôle promoteur pour les faibles concentrations, et un effet controversé (inhibiteur) en augmentant les concentrations (**Bahri, 2005**).

Les extraits aqueux de « *Costus igneus* » ont une action inhibitrice sur la cristallisation des phosphates de calcium (Brushite). Une augmentation de concentration des extraits implique une diminution dans le poids du calcul formé (**Manjula, 2012**).

Le jus de « *Cranberry* » est utile pour l'acidification du milieu urinaire ce qui est indiqué dans le traitement des cas de calculs rénaux d'apatite, Brushite et struvite (**Kibler, 2002**).

Le jus frais de « *Bryophyllum pinnatum salisb* » est connu dans la culture indienne dans le traitement des pathologies lithiasiques. Le jus inhibe la cristallisation des oxalates de calcium et réduit significativement la formation des phosphates calciques (Brushite et apatite) (**Gahlaut, 2012**).

L'évaluation de l'efficacité de l'extrait aqueux des racines de « *Achyranthes aspera* » sur la formation des calculs phosphatiques a permis de vérifier l'effet inhibiteur de cet extrait sur la Brushite. L'hydrogénophosphate de calcium dihydraté (Brushite) forme avec les composées de l'extrait des complexes ce qui implique une inhibition sur l'agrégation cristalline des phosphates. Ces résultats confirment l'effet anti lithiasique de l'extrait (**Diana, 2012**).

A decorative border with four floral motifs in the corners, each featuring a central flower and surrounding leaves. The border is composed of thin, dark lines.

Chapitre IV :
*Etude de la cinétique de
cristallisation de la brushite, en
absence et en présence d'extraits
aqueux de plantes médicinales,
par conductimétrie*

Introduction

La sursaturation est une condition nécessaire pour produire la cristallisation des espèces lithogènes (oxalate de calcium, phosphates, acide urique, cystine..). Des travaux ont montré que les urines des sujets lithiasiques sont saturées au même niveau que les urines des sujets témoins (**Robertson et al. 1976, Finlayson, 1978; Berland et al, 1984; Werness et a, 1985; Marangella et al, 1985**).

Les urines de ces derniers contiennent des inhibiteurs de la cristallisation présents dans l'urine et capables d'empêcher la cristallisation des espèces lithogènes (**Fleish, 1978; Jungers et al, 1989; Daudon et al, 1994**). Les facteurs de risque de formation des calculs urinaires sont déterminés à partir des conditions de cristallisation des différentes espèces lithogènes.

Si les travaux sur la cristallisation in vitro, de l'oxalate de calcium, sont nombreux, il n'en est pas de même pour la cristallisation des phosphates. Des auteurs (**Bahri, 2005**) ont réalisé une étude in vitro sur l'effet des eaux thermales et du thé vert de chine sur la cristallisation des phosphates. Les modèles proposés utilisent des solutions sursaturées se rapprochant des urines des sujets lithiasiques.

L'inhibition et la dissolution des cristaux de struvite phosphate ammoniaco magnésien a été étudié en présence d'Acacia, à pH=8 (**Beghalia et al., 2014**). Une autre étude portant sur la cinétique de précipitation des phosphates calciques a été suivie par microscopie optique à balayage équipé d'un appareil photographique (**Bahri, 2005 ; Beghalia, 2011**). Aussi, la technique « Single Diffusion Gel » a été utilisée dans l'étude de la cristallisation des phosphates, par plusieurs chercheurs (**Varghese, 2014 ; Joshi, 2005**). La nucléation de la brushite a été étudiée par la méthode turbidimétrique qui consiste à mesurer le trouble dans une solution (**Costa-Bauza, 2002**).

En Algérie, l'usage des plantes médicinales et des produits naturels est encore largement sollicitée par la population. Cet usage repose sur des recommandations faites par - ci et par-là, notamment sur les expériences et les croyances ethniques. Les indications traditionnelles connues de ces plantes sont essentiellement diurétiques, et les connaissances scientifiques sur leur usage sont encore très limitées. Dans ce contexte, une première approche expérimentale consiste à reproduire le milieu urinaire

sursaturée en brushite. L'action de quelques plantes médicinales sur la cristallisation de ce phosphate calcique permet d'étudier l'effet de ces plantes sur le risque lithogène phosphocalcique, in vitro. Dans la présente étude, la cristallisation de la brushite en milieu aqueux a été suivie par la conductimétrie, qui est une méthode simple à mettre en œuvre, elle nous permet de visualiser les différentes étapes de cristallisation de la brushite.

I Rappel théorique sur la conductivité

I.1 Conductance et conductivité d'une solution

La conductimétrie est une technique consistant à mesurer une grandeur physique, la conductance, inverse de la résistance électrique R d'un certain volume de solution. Pour des tensions appliquées faibles, les solutions ioniques se comportent comme des conducteurs chimiques, et à l'aide d'une simple cellule, d'un générateur de tension et d'un ampèremètre branché en série, la conductance peut être déduite à l'aide de la loi d'Ohm (**Herreillat, 2009 ; Givault, 2007**) :

$$U = R.I = I/G \quad (1)$$

Avec U : la tension appliquée aux électrodes en volts (V)

I : le courant circulant dans la solution en ampères (A)

R : la résistance de la solution en Ohm (Ω)

G : la conductance de la solution en siemens (S).

Un conductimètre mesure donc la conductance du volume de solution compris entre les deux électrodes en platine. La conductance dépend de ces deux électrodes utilisées pour la mesure (l'ensemble des deux électrodes est appelé une cellule de conductimétrie). La conductance d'une portion de solution ionique est d'autant plus grande que la surface immergée S des électrodes est grande et que la distance L entre ces dernières est petite.

La conductance d'une portion de circuit électrolytique est proportionnelle à S/L , elle se met alors sous la forme (**Herreillat, 2009 ; Givault, 2007**) :

$$G = \sigma \cdot S/L \quad (2)$$

Où **S** est la surface des électrodes en mètre carré (m²)

L est la distance séparant les deux électrodes en mètre (m)

Le rapport S/L caractéristique de la cellule de conductimètre est appelé « constante de cellule ».

La valeur de ce dernier est notée sur la cellule du conductimètre, mais sa valeur pouvant varier avec l'état de surface des électrodes, on la détermine préalablement en effectuant un étalonnage avec une solution de conductivité connue (en mesurant la conductance d'une solution étalon) (**Roger, 2001**).

σ (S.m⁻¹): représente la conductivité de la solution qui caractérise la capacité de la solution à conduire le courant électrique.

I.2 Facteurs influençant la conductance

La conductance d'une portion de solution ionique est une grandeur physique, elle dépend du système de mesure utilisé (cellule de conductimètre) et des caractéristiques de la solution étudiée (concentration, nature des ions et température)

1.2.1 Influence des caractéristiques géométriques de la cellule

Une cellule de conductimètre est composée de deux électrodes parallèles en platine. La conductance d'une solution électrolytique augmente lorsque la surface S des deux électrodes augmente et diminue lorsque la distance L entre les deux plaques de platine augmente. La conductance mesurée est donc proportionnelle au rapport S/L et par suite elle dépend de la géométrie de la cellule.

Pour une cellule donnée, la conductance et la conductivité d'une solution sont proportionnelles.

1.2.2 Influence des caractéristiques de la solution

La conductivité est une caractéristique de la solution, elle ne dépend que des facteurs physico-chimiques relatifs à la solution.

1.2.2.a La nature de l'électrolyte

La conductivité et la conductance d'une solution sont linéairement liées à l'intensité du courant circulant. Le courant électrique dans la solution provient du déplacement des ions sous l'influence du champ électrique appliqué, plus ce déplacement est rapide et plus le courant sera important (**Coury, 1999**).

La conductivité de la solution va donc dépendre à la fois des ions présents dans la solution et de leur charge électrique c.à.d. leur mobilité dans le milieu. Les ions les plus petits étant les plus mobiles et donc les plus conducteurs du courant et par suite leur conductivité est importante.

Les cations et les anions vont se déplacer en sens opposé sous l'influence d'un champ électrique, mais leurs charges électriques étant elles aussi opposées, leurs contributions au courant total s'additionnent.

La conductivité de la solution est donc la somme des termes relatifs à chacun des ions présent dans la solution. On aura (**MARUCCO, 2004**) :

$$\sigma = \sum K_i \cdot C_i \cdot \mu_i \quad (3)$$

Où K_i est la constante de proportionnalité caractéristique de l'ion i .

C_i : la concentration molaire de l'ion i en mole/l

μ_i : la mobilité de l'ion i , elle est définie comme la vitesse de déplacement de l'ion i dans le champ électrique.

1.2.2.b La concentration de la solution

La conductivité de la solution dépend de la nature des ions et de leurs concentrations. Plus la concentration molaire en soluté apporté est élevée, plus la conductivité est grande, car il y a plus de porteurs de charges (**Roger, 2001**).

La conductivité ionique d'un ion est égale au produit de sa conductivité molaire ionique λ_i par sa concentration C_i (**Cachau, 2009 ; Givault, 2007**) :

$$\sigma_i = C_i \cdot \lambda_i \quad (4)$$

A l'intérieure d'une solution électrolytique, chaque ion apporte sa contribution au passage du courant électrique et par suite la conductivité d'une solution ionique est la somme des conductivités ioniques des ions qu'elle contient, donc on a (Marucco, 2004) :

$$\sigma = \sum \sigma_i = \sum \lambda_i \cdot C_i \quad (5)$$

La conductivité d'une solution électrolytique est reliée linéairement aux concentrations des ions présents en solution et donc la conductivité augmente quand la concentration molaire en soluté apporté augmente.

1.2.2.c La température de la solution

La conductivité d'une portion de solution électrolytique varie avec la variation de la température du milieu réactionnel. Quand cette dernière augmente les ions présents dans la solution deviennent plus mobiles, ce qui donne une augmentation de la valeur du courant circulant dans la solution et par suite une élévation de la conductivité (Mantynen, 2001).

II Modèle conductimétrique de la cristallisation de la Brushite

Les études de cristallisation in vitro permettent de préciser les conditions cinétiques et thermodynamiques de formation et de croissance des espèces cristallines et l'influence de diverses substances inhibitrices ou promotrices sur le processus de cristallisation. Les modèles peuvent utiliser des solutions aqueuses sursaturées, des urines synthétiques ou des urines diluées ou totales.

Notre objectif est d'étudier les phénomènes de cristallisation de la brushite in vitro, dans un modèle qui nous permet de tester l'effet inhibiteur de quelque plantes médicinales sur la cristallisation de l'espèce lithogène et ainsi évaluer leur efficacité et par conséquent leur usage dans la prévention de la formation des calculs urinaires.

II.1 : Méthodologie

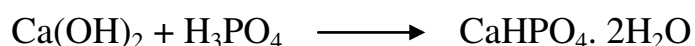
Le modèle de cristallisation des phosphates de calcium in vitro proposé dans ce travail a été développé par Ferreira et al (Ferreira et al, 2003). C'est un modèle simple sans

ensemencement qui permet par le suivi de la cinétique de cristallisation dans un milieu aqueux (urine artificielle), d'étudier les différentes étapes de cristallisation de phosphates de calcium, notamment la brushite. De plus son application à l'étude des inhibiteurs permet de comprendre les effets de diverses substances inhibitrices ou inductrices de la cristallisation.

En milieu aqueux, la brushite est synthétisée, soit par double décomposition d'un sel de calcium et d'un sel de phosphate (**Jensen et Rathlev, 1953**), soit par neutralisation de l'acide phosphorique dans la chaux (**St Pierre, 1955**).

La neutralisation de la deuxième acidité de l'acide orthophosphorique conduit aux hydrogénophosphates de calcium de rapport atomique Ca / P = 1, parmi lesquels se trouve le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) ou brushite de formule chimique $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. C'est un composé à caractère acide qui cristallise généralement sous forme de plaquettes, mais qui peut également prendre l'aspect d'aiguilles (**Curry, 1971 ; Ferreira et al, 2003**). En effet, les cristaux de brushite sont constitués de feuillets ondulés de composition CaHPO_4 , arrangés parallèlement les uns aux autres, et liés entre eux par une double couche de molécules d'eau (**Tadier, 2009**).

La cinétique de cristallisation de la brushite a été suivie par conductimétrie. Cette méthode permet la mesure de la conductivité d'une manière continue d'une solution électrolytique en fonction du temps. Un volume de 75ml de la solution d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) de concentration 0,1M est versé dans une enceinte de 300ml. Une fois la température atteint 37°C , un volume égal de la solution d'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ à 0,1M, préalablement maintenu à 37°C , est ajouté dans l'enceinte (conformément à la réaction ci-dessous) et la mesure de la conductivité est immédiatement déclenchée.



Le conductimètre utilisé est de type inoLab Cond Level 1. Le mélange réactionnel est maintenu constamment sous agitation constante (270 tours /mn) et à une température fixe de 37°C (à l'aide d'un bain marie thermostaté). Le contrôle de la cristallisation de

la brushite a été assurée par le suivi de la formation des cristaux par microscopie optique à polarisation. Au bout de 3 heures, le mélange réactionnel est retiré du bain marie et filtré sous vide sur membrane 0,45 μ m. Le précipité blanc obtenu est séché à température ambiante à l'air libre pendant 2 jours, puis pesé afin de calculer le rendement. Six essais sont réalisés dans les mêmes conditions, afin de vérifier si le modèle est reproductible. Bien que la cristallisation des phosphates est pH-dépendante, nous avons opté pour la mesure de l'évolution spontanée du pH correspondant à la cristallisation de la brushite. Toutefois, la valeur du pH du milieu a été relevée en début de la réaction, puis après 1 heure et à la fin de la cristallisation.

Le montage expérimental utilisé pour la cristallisation de la brushite est représenté dans la figure IV.1



Figure IV.1 : Photo illustrant le montage expérimental utilisé pour le suivi conductimétrique de la cristallisation de la brushite en milieu aqueux.

II.2 Caractérisation des cristaux :

Dans cette approche expérimentale et pour chaque essai, le précipité obtenu après filtration du mélange réactionnel a été caractérisé par plusieurs méthodes physiques d'analyse.

II.2.1 Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

Le Microscope électronique à balayage utilisé est du type TM1000 équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie des RX (DRX). Dans un premier temps, l'échantillon à analyser est fixé entièrement et collé sur un porte échantillon en métal et de forme circulaire, adaptable au porte-objet du microscope. Le dispositif contenant l'échantillon est placé dans la chambre intérieure du microscope et peut être déplacé à l'aide de verniers pour réaliser le balayage.

L'échantillon ne passe pas par une métallisation préalable car le microscope possède une caractéristique de pression contrôlée ainsi un détecteur d'électrons rétrodiffusées produit des électrons primaires produits à partir d'un filament de tungstène chauffé à 2700K.

II.2.2 Analyse par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Cette technique permet l'analyse de composés en observant les fréquences des principales vibrations. Les différents échantillons solides récupérés après filtration de la solution obtenue à la fin de la cristallisation de la brushite, ont été analysés par infrarouge (IRTF), à l'aide d'un spectromètre «Bruker Alpha FT-IR Spectrometer», équipé de ALPHA platine d'ATR d'une simple réflexion et du module de diamant d'ATR, disponible à l'université d'Es Sénia. Les échantillons ont été analysés sans préparation préalable.

II.2.3 Analyse par diffraction aux rayons X (DRX)

Les échantillons de poudre retenus à la fin des tests ont été soumis à l'analyse par DRX. Le diffractomètre de rayons X utilisé est du type D8 Advance BRUKER, utilisant la radiation monochromatique K α 1 du cuivre (CuK α -radiation) ($\lambda = 0,154$ nm) à 45 kV et à 40 modes de mA et de balayage continu.

II.3 Résultats :

II.3.1 Cinétique de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence).

Le relevé des valeurs de la conductivité en fonction de temps donne une courbe représentée dans la figure IV.2.

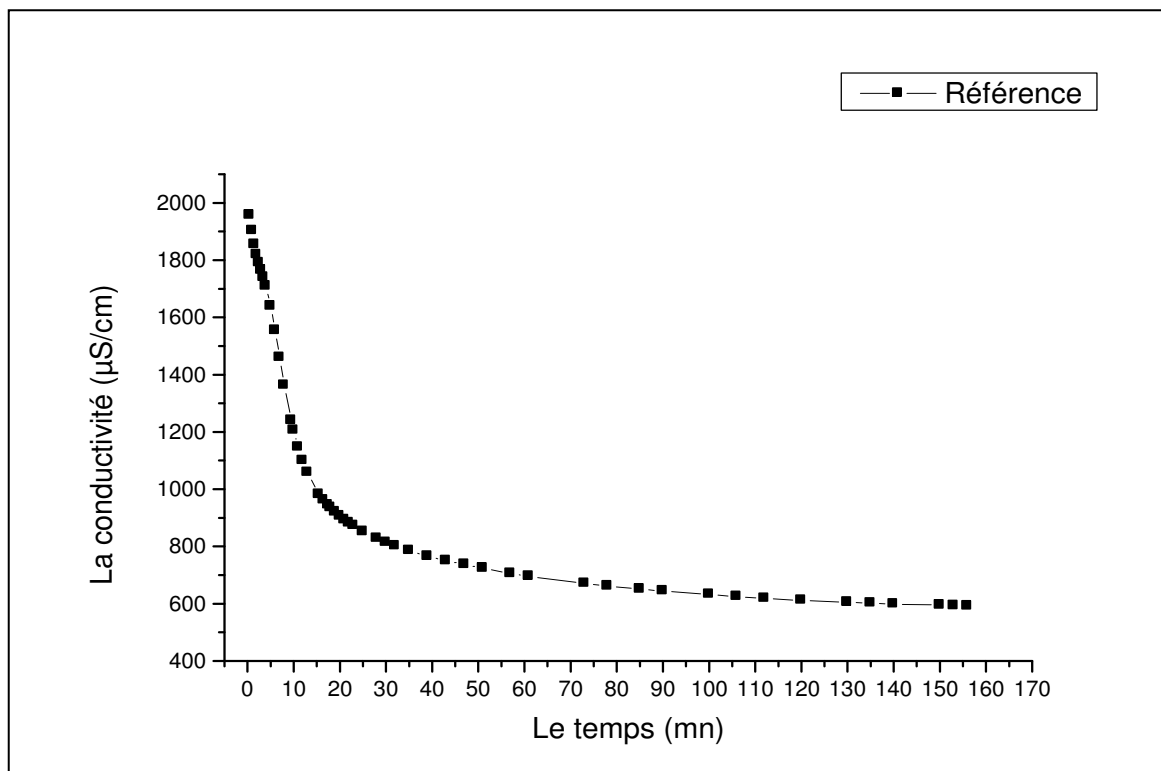


Figure IV.2 : Courbe conductimétrique de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence)

La courbe peut être divisée en trois parties :

- La première partie correspond à la première phase de cristallisation de la brushite qui est la nucléation.
- La deuxième partie correspond à la phase de croissance cristalline. Le paramètre cinétique qui la caractérise est la pente de la partie linéaire ascendante où le coefficient de corrélation R est supérieur à 0.9.
- La troisième partie représente la phase d'agrégation cristalline là où presque tous les cristaux de brushite sont formés. Il y aura un assemblé des cristaux qui donnent naissance à des agrégats de brushite.

Il apparaît que dans la courbe conductimétrique expérimentale de cristallisation de la brushite, la phase de nucléation n'est pas observable, car la formation des premiers cristaux d'apatite a lieu dès le début de la réaction.

La courbe obtenue admet une plage linéaire caractérisée par une pente et un coefficient de corrélation R^2 (voir figure IV.3).

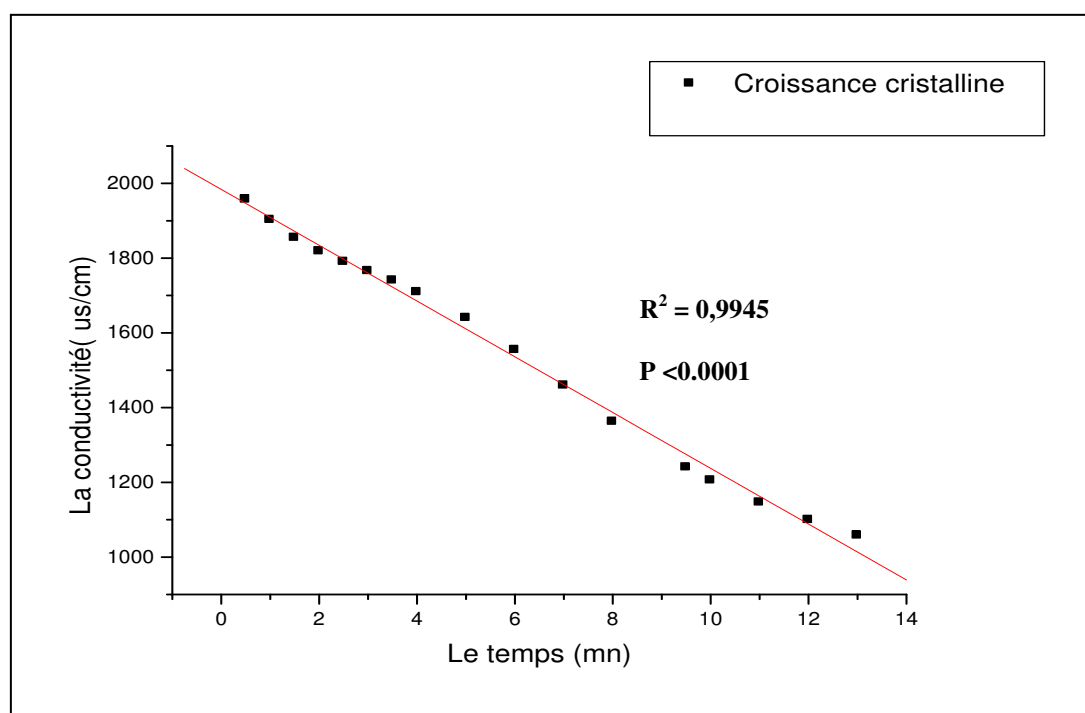


Figure IV.3: Evolution de la croissance des cristaux de brushite

Six essais sont réalisés dans les mêmes conditions et six pentes caractérisant la croissance des cristaux de brushite sont déterminées. Ainsi, les paramètres cinétiques conductimétriques (la moyenne des pentes, l'écart type et le coefficient de variation CV, qui doit être inférieur à 10%, sont déduits à partir des six courbes obtenues.

Le tableau IV.1 résume les paramètres conductimétriques de la courbe de cristallisation de la brushite.

Tableau IV.1 Paramètres conductimétriques de la cinétique de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante.

Echantillon	Δt (mn)	La pente	Coefficient de corrélation R^2	Coefficient de Variation CV(%)
Sans inhibiteur (référence)	0,5-13	-74,62519	0,9945	6 %

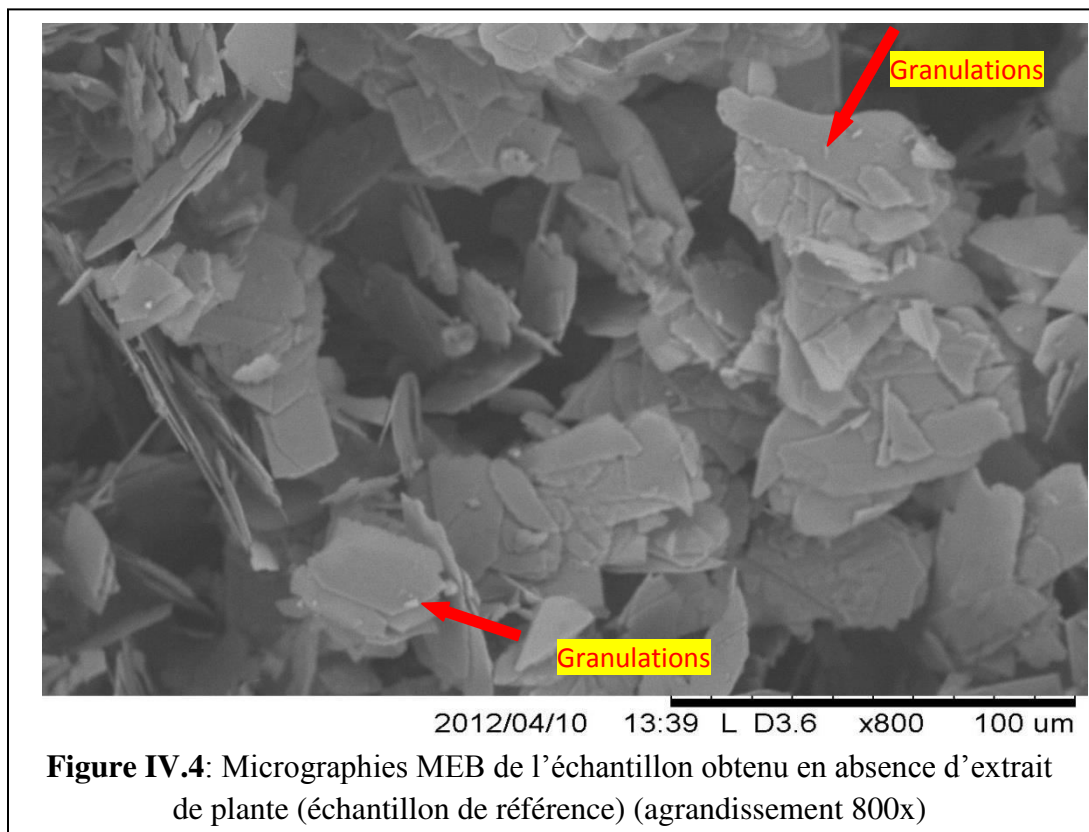
Quant aux valeurs du pH, elles restent dans l'intervalle de précipitation de la brushite : pH(initial) = 5,7; pH (après 1h de réaction) = 5,5 et pH(final de cristallisation de la brushite) = 6,2. En effet, la brushite se forme spontanément dans les urines relativement plus acides (pH moyen= 6,35) que les autres phosphates, même si elle peut les accompagner à des pH parfois élevés (**Daudon et al, 2012**).

II.3.1.1 Caractérisation des cristaux :

II.3.1.1.1 Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

L'observation en Microscopie Electronique à Balayage du filtre contenant les cristaux retenus par filtration de la solution obtenue après cristallisation de la brushite, en absence d'extraits de plantes (l'échantillon de référence) montre la présence n'innombrables agrégats et macles de cristaux de brushite en forme de plaques plates (voir figure IV.4).

Ces grands amas de cristaux de brushite sont accompagnés de rares granulations (voir figure IV.4), dont l'identification s'avère impossible à faire à ce niveau de l'analyse vu la taille de ces particules qui ne permet pas d'observer leur faciès.



II.3.1.1.2 Analyse par Spectroscopie Infrarouge (IRTF)

L'échantillon obtenu après filtration de la solution, en absence d'extrait de plante a été caractérisé par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) à l'aide d'un spectromètre de type Bruker FT-IR, disponible à l'Université d'Es Sénia.

Les résultats spectraux obtenus ont été comparés avec les données spectrales de la brushite pure (Daudon et al, 2012 ; Fellahi, 2011). Il apparait alors que le spectre IR de l'échantillon synthétisé a la même allure que le spectre de la brushite pure, ainsi que les valeurs des pics caractéristiques de la brushite sont très voisines (avec un très léger déplacement des valeurs vers la droite). Les bandes caractéristiques de la brushite sont : la vibration bifide à 3532,43 et 3473,29 cm^{-1} (vibrations de valence des molécules d'eau), le triplet à (1124,93, 1051,42 et 982,48) cm^{-1} et des bandes secondaires des phosphates à 574,06 et 518,32 cm^{-1} .

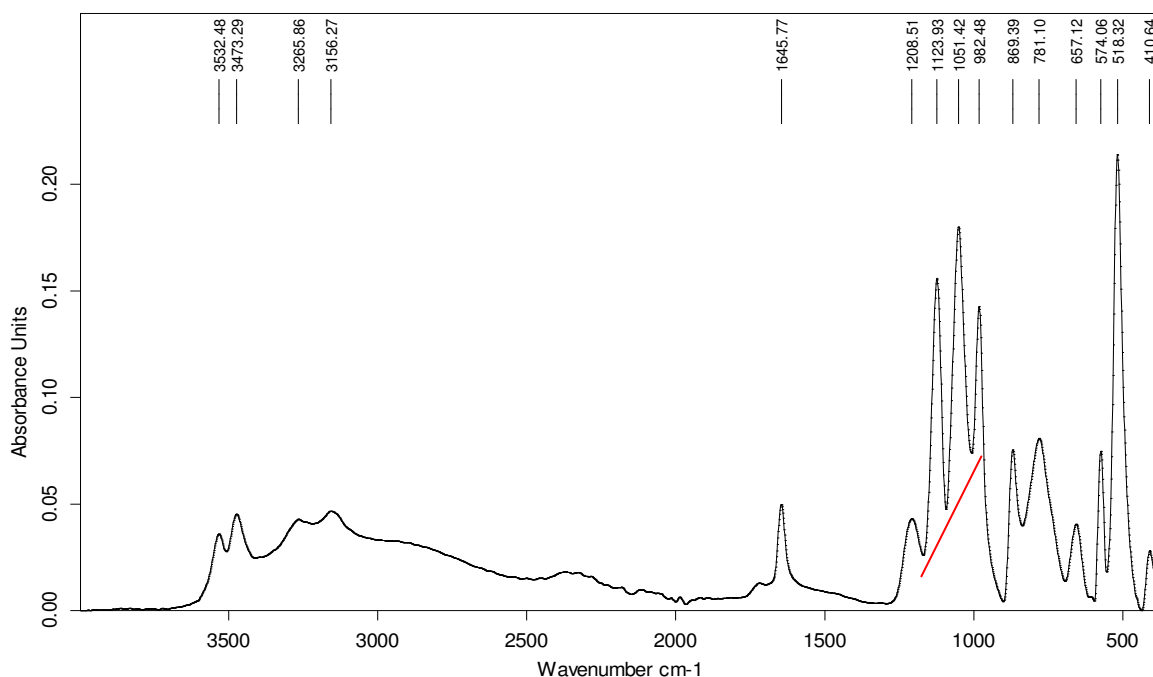


Figure IV.5: Spectre IR de l'échantillon obtenu à la fin de la réaction)

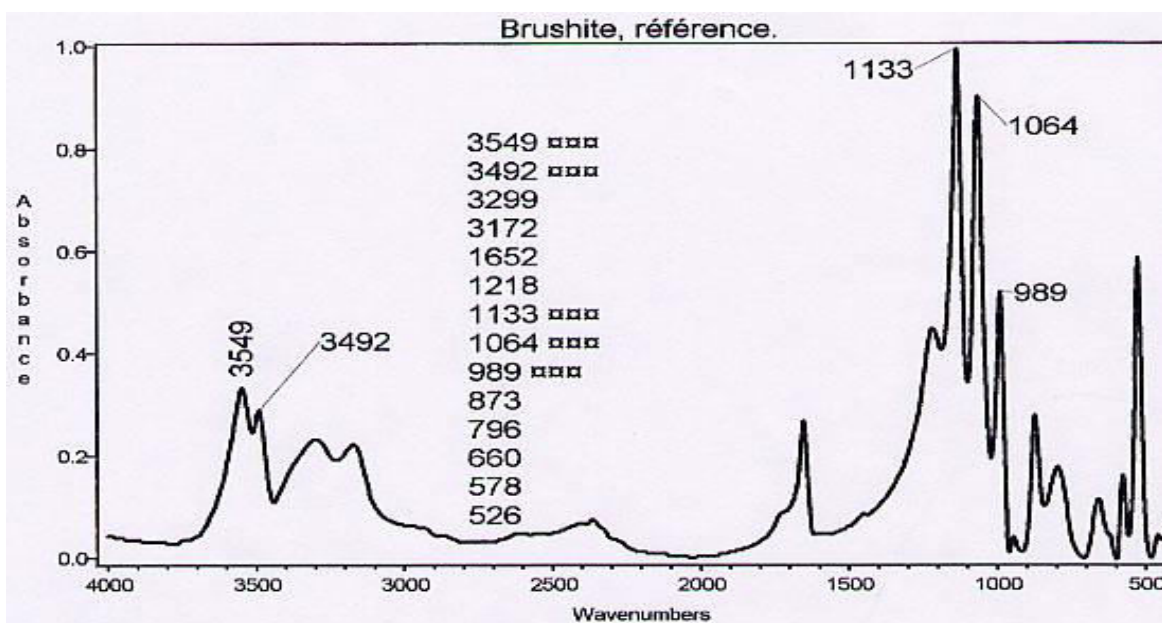


Figure IV.6: Spectre IR de la brushite pure (Fellahi, 2011 ; Daudon et al, 2012)

Nous pouvons conclure que l'échantillon cristallisé est bien la Brushite, toutefois un autre phosphate de structure cristalline hexagonale, à l'état de traces, coexiste avec la brushite. En effet, cela est détecté par rapport à l'allure du triplet à $(1124,93, 1051,42$ et $982,48) \text{ cm}^{-1}$ qui est différente de celle observée dans le spectre de la Brushite pure. Selon les travaux de **Ferreira et al (2003)** il apparaît que l'hydroxyapatite (HAP) est le premier précipité qui se forme en début de la réaction de cristallisation de la brushite. Le procédé évolue vers la formation de la brushite, qui est la seule phase présente à la fin de la réaction. Par conséquent, les traces d'apatite formée est soit de la carbapatite, soit du PACC.

II.3.1.1.3 Analyse par Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction aux rayons X a donné le spectre, illustré dans la figure IV.7. Ce spectre a été identifié comme étant celui de la Brushite.

Chapitre IV : Etude de la cinétique de cristallisation de la brushite, en absence et en présence d'extraits aqueux de plantes médicinales, par conductimétrie

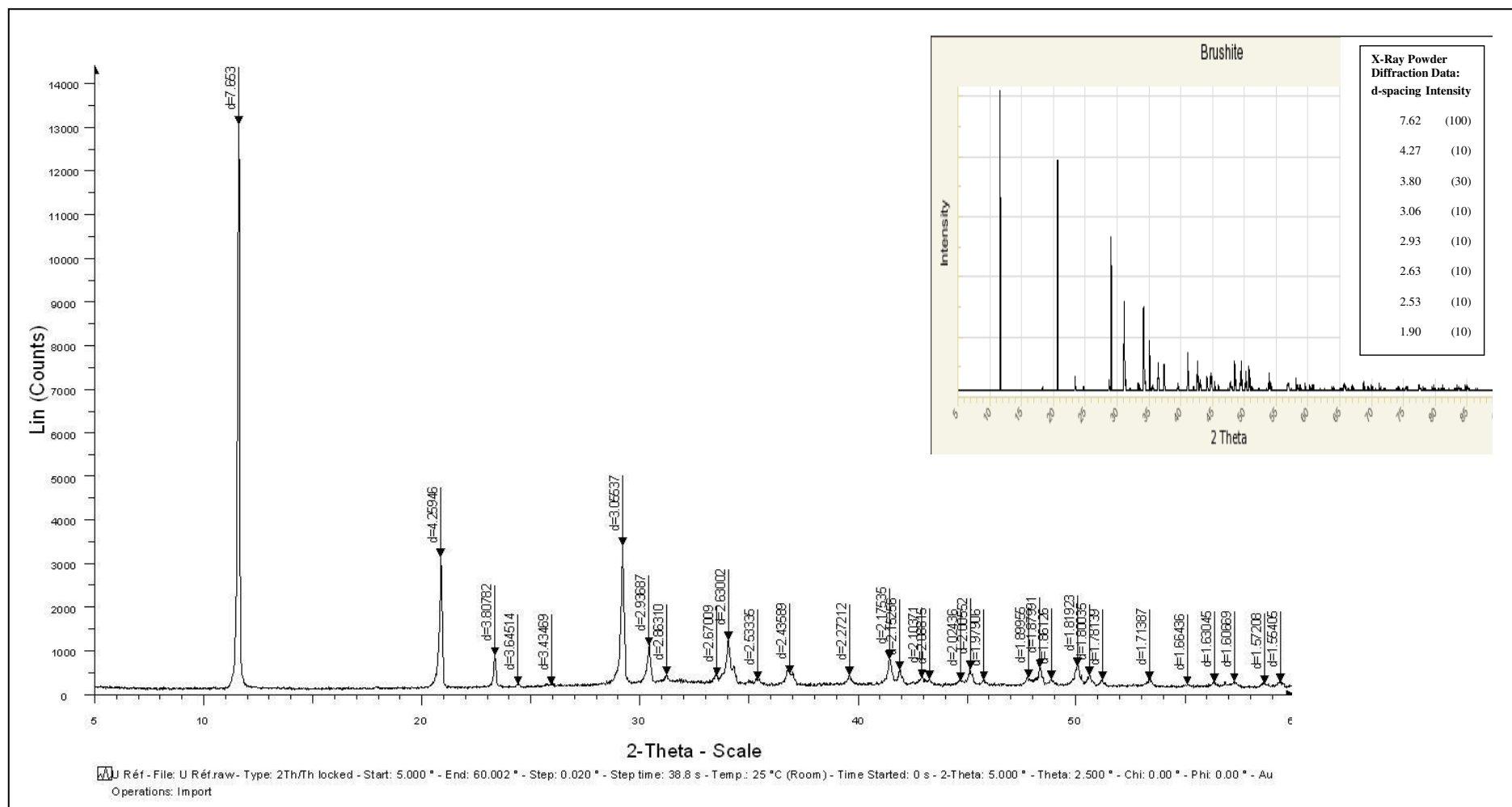


Figure IV.7: Diagramme DRX de l'échantillon obtenu en fin de réaction

II.3.2 Cinétique de cristallisation de la brushite en présence d'extraits aqueux de plantes

L'usage des infusions de plantes naturelles par les lithiasiques comme un moyen de cure, nous a amené à entreprendre l'étude de l'effet de quelques plantes médicinales sur la cristallisation in vitro des phosphates calciques. Notre objectif est de mettre en évidence une éventuelle action inhibitrice ou inductrice des plantes sur la cristallisation, in vitro, de la Brushite.

II.3.2.1 Méthodologie :

II.3.2.1.a. Préparation des extraits aqueux de plantes médicinales :

Les plantes médicinales testées ont été lavées plusieurs fois à l'eau distillée pour les débarrasser de la poussière, ensuite séchées à l'air libre pendant 2 à 7 jours.

Les plantes utilisées dans ce modèle sont : *Phoenix dactylifera L* (poudre de noyaux de dattes), *Trigonella foenum* (fenugrec), *Malus pumila* (pelures de pomme), *Cerasus vulgaris* (queues de cerise), *Rubia tinctorum L* (garance).

Après séchage, les pelures de pommes et les queues de cerises et les grains de fenugrec ont été utilisés sans préparation préalable alors que les noyaux de dattes variété Deglat Nour et les racines de garance, qui sont des substances très dures, ils ont été finement broyés avant leur utilisation (voir figure IV.8).

La solution mère de toutes les plantes médicinales testées a été préparée par une infusion de 40g de la plante ou la poudre de plante, dans un litre d'eau distillée bouillante. Après 10mn, l'infusion est filtrée sur papier filtre, suivie par une filtration sous vide sur membrane 0,45µm. Pour chaque plante médicinale utilisée, des solutions aqueuses filles à différentes concentrations (0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 1) g/L ont été préparées par dilution à partir de la solution mère déjà préparée par infusion.

Concernant le suivi cinétique de la cristallisation de la Brushite, en présence d'extraits aqueux de plantes médicinales, nous avons utilisé la même méthodologie que celle de la cristallisation de la brushite (sans inhibiteur). Le modèle adopté est celui proposé par Ferreira et al (**Ferreira et al ; 2003**).

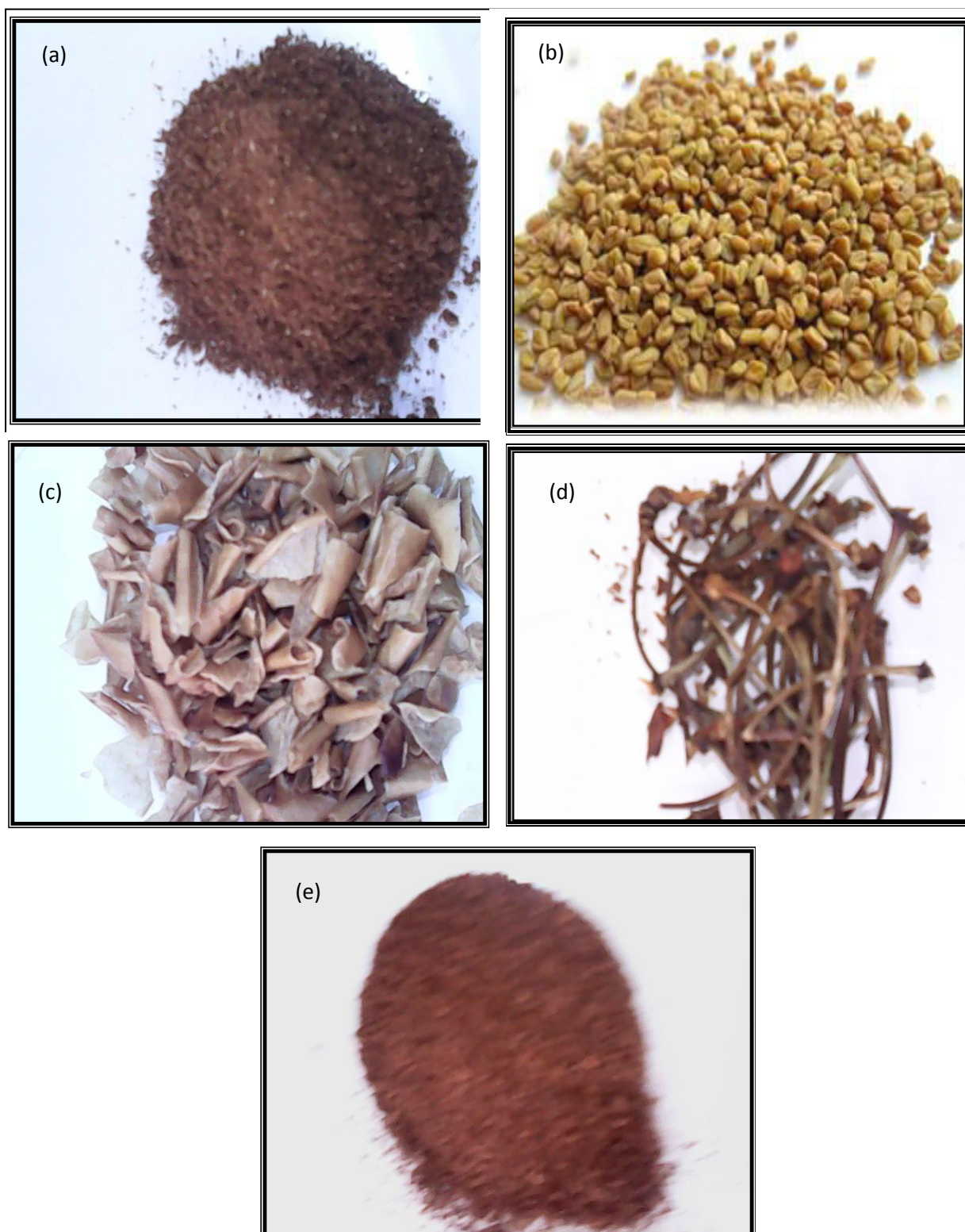


Figure IV.8: Photos de l'aspect de quelques plantes utilisées. a): poudre de noyaux de dattes '*Phoenix dactylifera L*'; b): grains de '*Trigonella foenum*'; c): pelures de pommes '*Malus pumila*'; d): queues de cerises '*Cerasus vulgaris*'; e): racines de la garance '*Rubia tinctorum L*'.

II.3.2.1.b. Cristallisation de la brushite en présence d'extraits aqueux de plantes médicinales, dans le modèle conductimétrique

La cristallisation de la brushite a été réalisée en mélangeant des volumes égaux de la solution d'acide orthophosphorique de concentration 0,1M et l'extrait aqueux de plante à différentes concentrations. Une fois que la température du mélange atteint 37°C, un volume égal de la solution de chaux à 0,1M, préalablement maintenue à 37°C, est ajouté au mélange réactionnel. La mesure de la conductivité est immédiatement déclenchée. Les solutions sont maintenues tout le temps sous agitation constante et à une température de 37°C.

En présence de chaque plante, l'extrait aqueux a été testé dans un intervalle de concentration de 0,0625 à 1g/L. Pour chaque concentration de l'extrait aqueux, le relevé des valeurs de la conductivité en fonction du temps donne une courbe dont l'allure est illustrée dans la figure IV.2. Nous déterminons alors la pente conductimétrique de la partie linéaire et le coefficient de corrélation R.

Pour chaque test, six essais sont réalisés dans les mêmes conditions et six pentes conductimétriques sont déterminées. La moyenne des pentes, l'écart type et le coefficient de variation CV qui doit être <10%, sont déduits.

Les paramètres de conductivité ainsi obtenus sont comparés avec ceux déterminés précédemment en absence d'extrait de plante (échantillon de référence) (voir le tableau IV.1).

Pour chaque concentration d'extrait de plante, le pourcentage d'inhibition (taux d'inhibition) par rapport à la croissance de la brushite est calculé par la relation :

$$\%I = (1 - P_{ai}/P_{si}) \cdot 100 \quad (6)$$

Avec %I : taux d'inhibition

P_{ai} : pente conductimétrique en présence d'inhibiteur

P_{si} : pente conductimétrique en absence d'extrait de plante

A la fin de chaque test, les échantillons ont été filtrés sous vide, sur membranes 0,45 μ m. Ils ont été soumis à l'analyse par des méthodes spectroscopiques.

II.3.2.3 Résultats

II.3.2.3.1 Etude de l'effet des extraits aqueux de *Phoenix dactylifera L* (noyaux des dattes) sur la cristallisation de la brushite

La datte est un fruit de grande valeur alimentaire et très énergétique. Les noyaux de dattes sont caractérisés par une richesse en fibres, en protéine et en huile à haute valeur ajoutée. Les populations oasiennes ont su mettre au point des préparations médicinales à base de dattes et de leur sous produits. Une de ces préparations, l'infusion de poudre de noyaux de dattes, est recommandée dans le traitement de la lithiase urinaire à cause de son fort pouvoir diurétique, mais sans préciser le type de calcul urinaire. Cette étude se propose de déterminer l'effet des extraits aqueux de poudre de noyaux de dattes aux concentrations, sur la cristallisation de la brushite en milieu aqueux. Les concentrations des extraits de *Phoenix dactylifera L* sont : 0,0625 g/L (D₁), 0,125 g/L (D₂), 0,25 g/L (D₃), 0,5 g/L (D₄) et 1 g/L (D₅).

En présence des extraits de noyaux de dattes, aux différentes concentrations testées les courbes conductimétriques obtenues (voir figure IV.9) ont toutes l'allure de la courbe de conductimétrie de référence (voir figure IV.2), obtenue dans la cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante.

Pour chaque concentration de l'extrait de noyaux des dattes, l'expérience a été répétée 6 fois afin de déterminer le coefficient de variation qui doit être < 10%.

Les paramètres cinétiques obtenus par le suivi conductimétrique de la cristallisation de la brushite (voir tableau IV.3) sont comparés avec ceux déterminés précédemment en absence d'extrait de plante (échantillon de référence).

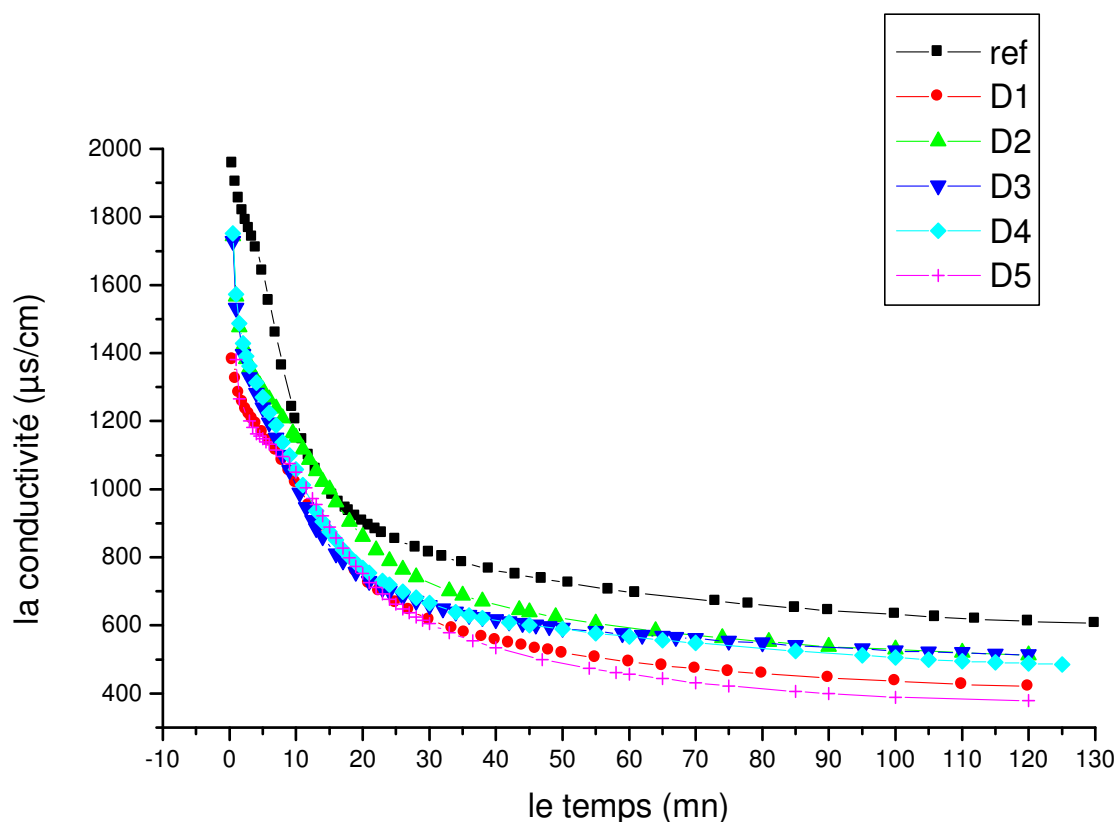


Figure IV.9: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence des extraits de noyaux de *Phoenix dactylifera L.*

Tableau IV.3 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence des extraits aqueux de *Phoenix dactylifera L.*

Essai	ΔT mn	La Pente	R^2	P	CV %	Inhibition %
Sans inhibiteur	0.5-15.5	-74.625	0.9940	<0.0001	6	
D1(C=0.0625 g/L)	1.5-30	-25.111	0.9901	<0.0001	5,3	66.49%
D2(C=0.125 g/L)	2.5-28	-26,475	0,9935	<0.0001	4,8	64.52%
D3(C=0.25 g/L)	2-17	-41.243	0.9938	<0.0001	5,6	44.72%
D4(C=0.5 g/L)	1.5-20	-37,315	0,9924	<0.0001	3,9	50.00%
D5(C=1 g/L)	1.5-33	-23.425	0.9906	<0.0001	4,3	68.61%

A la lumière des résultats résumés dans le tableau IV.3, il apparaît d'abord que tous les CV sont inférieurs à 10%, ce qui témoigne de la reproductibilité du modèle.

D'autre part, le temps d'induction de la croissance cristalline de la brushite augmente quand la concentration de l'extrait de *Phoenix dactylifera L.* augmente (il passe de 0.5 mn pour l'échantillon de référence à 2.5 mn pour l'échantillon D₂), ce qui signifie que plus l'extrait est concentré, plus l'étape de croissance des cristaux de brushite est retardée. Les pourcentages d'inhibition sont significatifs pour les concentrations D₁ ; D₂ et D₅, et moyens pour les concentrations intermédiaires D₃ et D₄. Cette variation du %I montre que les extraits aqueux inhibent significativement à modérément la cristallisation de la brushite, mais sans variation linéaire par rapport à la concentration de l'extrait de la plante.

II.3.2.3.1.a Analyse par spectroscopie IRTF

L'analyse par infra rouge du solide recueilli à la fin des tests, en présence de l'extrait de dattes à 0.0625 g/L et l'identification avec le spectre de référence, montre que les cristaux formés sont ceux de la brushite.

◆ II.3.2.3.1.a.1 Echantillon D₁ : En présence d'extrait de noyaux *Phoenix dactylifera* à la concentration C₁=0,0625g/L.

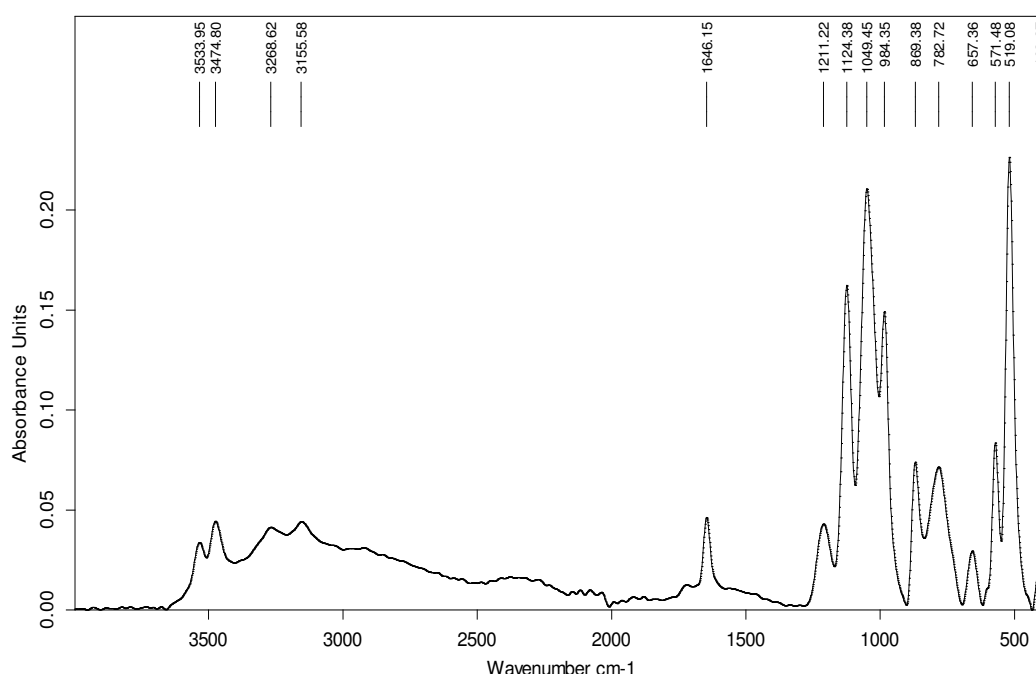


Figure IV.10: Spectre IR de l'échantillon D₁ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration C₁= 0,0625g/L)

Le spectre obtenu montre des bandes caractéristiques de la brushite (voir figure IV.10). Il comporte des fréquences caractéristiques des phosphates (un triplet à 1124,38 ; 1049,45 et 984,35 cm^{-1}) et des molécules d'eau (les vibrations bifides à 3533,95 et 3474,80 cm^{-1}). On note aussi les bandes secondaires des phosphates en forme acide (HPO_4^{2-}) à 571,48 et 519,08 cm^{-1} un épaulement à 600 cm^{-1} montre la présence de carbapatite, à l'état de traces.

◆ II.3.2.3.1.a.2 Echantillon D_2 : En présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration $C_2=0,125\text{g/L}$.

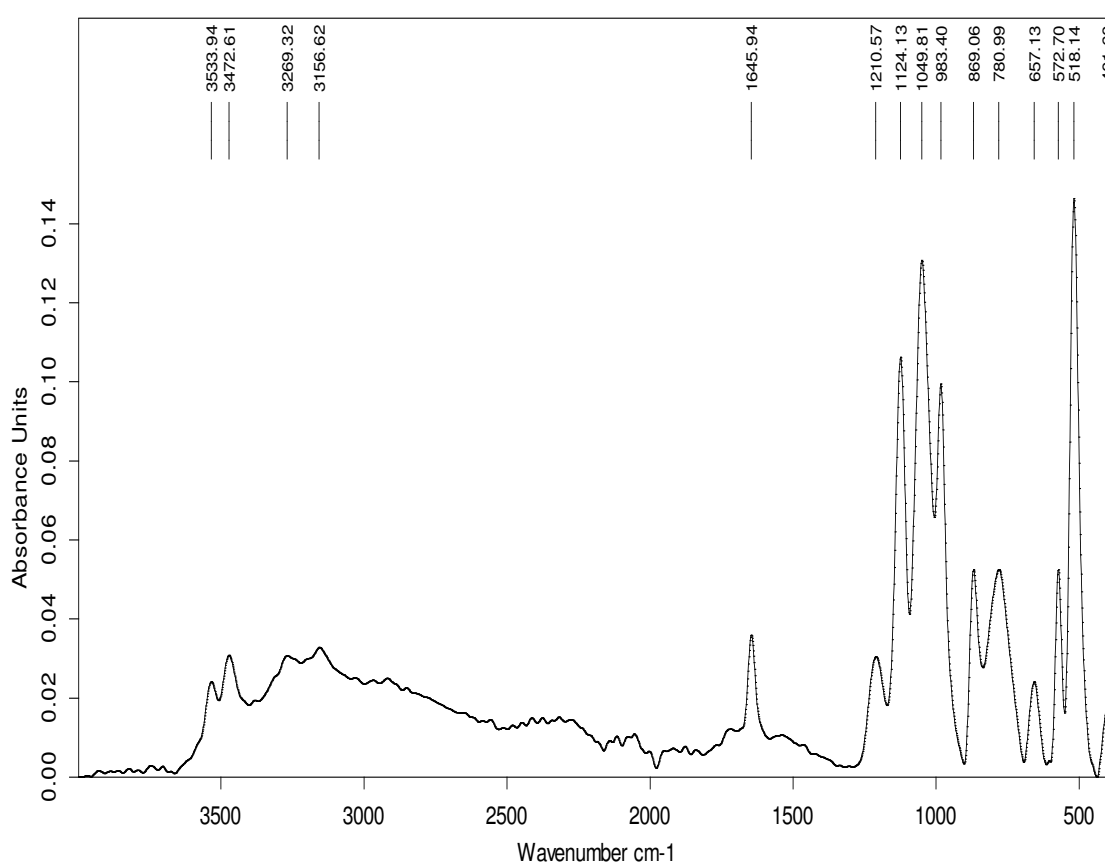


Figure IV.11: Spectre IR de l'échantillon D_2 (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration $C_2= 0,125\text{g/L}$)

Le spectre obtenu par analyse spectroscopique confirme la présence de brushite. On note une bande bifide à 3533,94 et 3472,61 cm^{-1} (vibrations de valence H_2O), un triplet à 1124,13 ; 1049,81 et 983,40 cm^{-1} (vibrations phosphate), des bandes secondaires à 572,70 et 518,14 cm^{-1} . Un petit épaulement au voisinage de 600 cm^{-1} indique la présence des traces de carbapatite (voir figure IV.11).

◆ II.3.2.3.1.a.3 Echantillon D₃ : En présence d'extrait de noyaux *Phoenix dactylifera L* à la concentration C₃=0,25g/L.

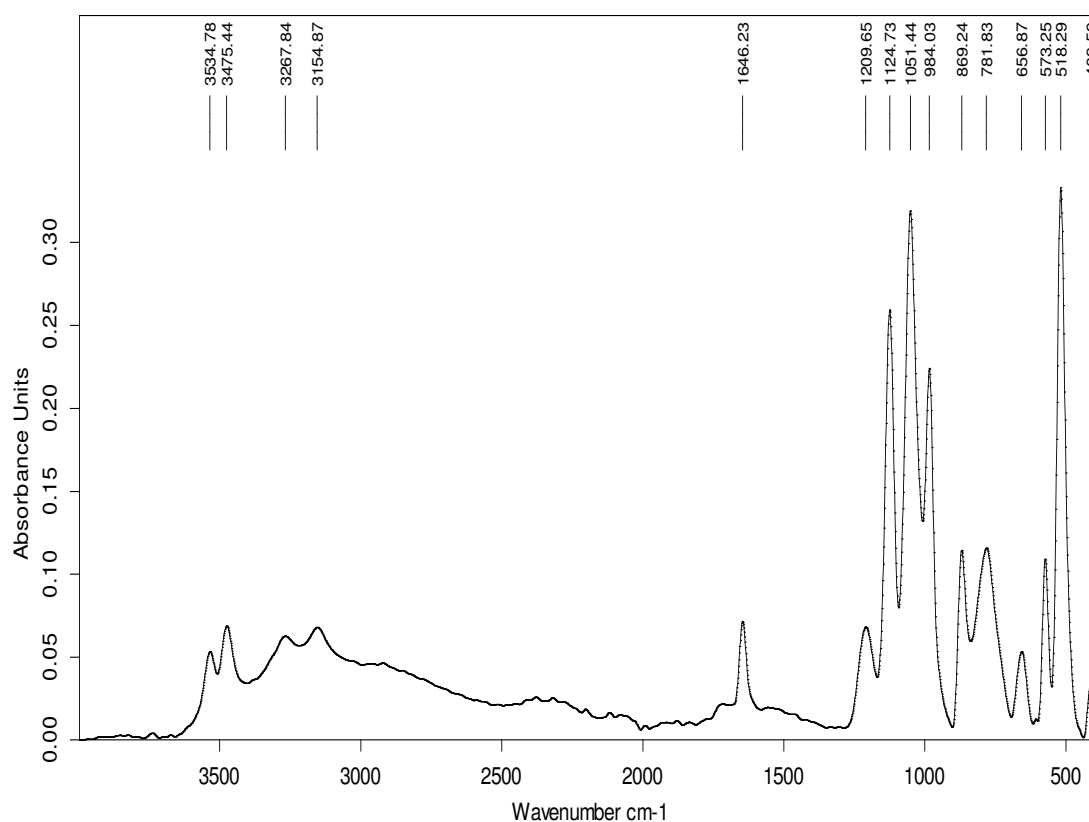


Figure IV.12: Spectre IR de l'échantillon D₃ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration C₃= 0,25g/L)

Le spectre IRTF donne l'ensemble des fréquences observées qui confirment que l'espèce formée est la brushite (voir figure IV.12). De plus, la carboapatite existe à l'état de traces (épaulement à 600 cm⁻¹).

◆ II.3.2.3.1.a.4 Echantillon D₄ : En présence d'extrait de noyaux *Phoenix dactylifera* à la concentration C₄=0,5g/L.

L'analyse par IRTF du précipité obtenu à la fin de la présente cristallisation (voir Figure IV.13), confirme qu'il s'agit bien de Brushite (doublet à 3534,85 et 3473,71 cm⁻¹ et le triplet à 1125,22 ; 1038,98 et 985,70 cm⁻¹). Toutefois, nous observons une différence par rapport au spectre de la brushite pure et même par rapport aux tests précédents, il s'agit d'un élargissement et un arrondissement de la bande à 1038.9

cm⁻¹ attribués à la présence d'une faible quantité de phosphate de calcium amorphe PACC. L'épaulement à 600 cm⁻¹ indique la présence des traces de carapatite.

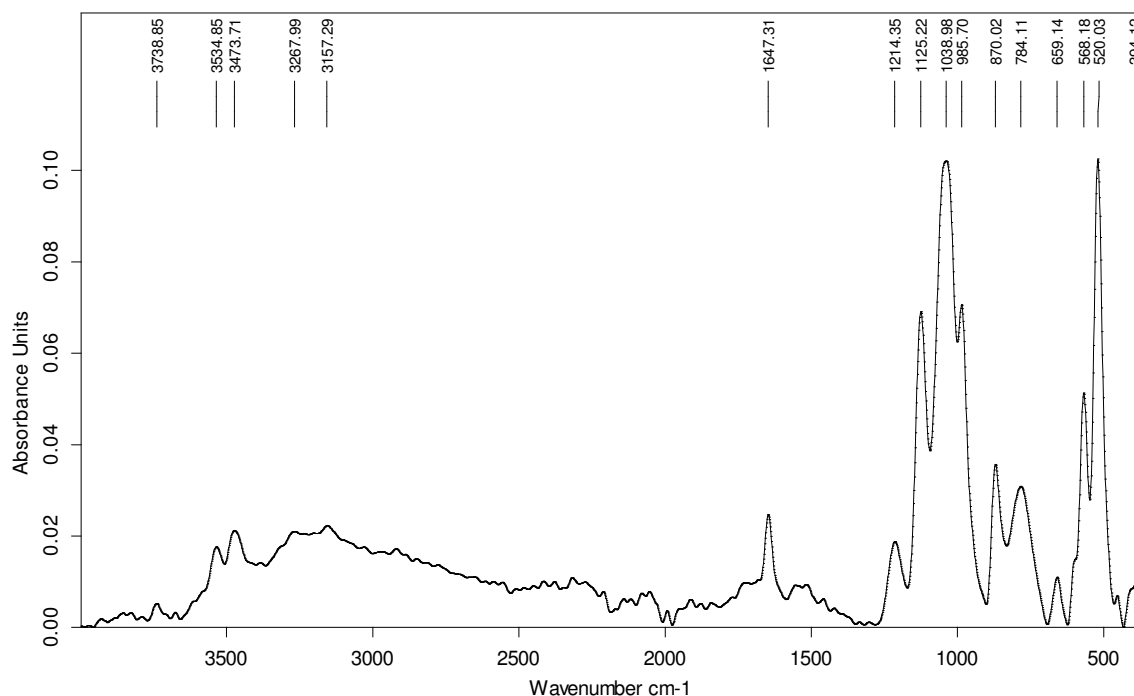


Figure IV.13: Spectre IR de l'échantillon D₄ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration C₄= 0,5g/L)

◆ **II.3.2.3.1.a.5 Echantillon D₅: En présence d'extrait des noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration C₅=1g/L.**

L'analyse spectrale IRTF du précipité blanc recueilli à la fin de la cristallisation de la brushite en présence de l'extrait aqueux de dattes à 1g/L, montre qu'il s'agit toujours du spectre typique de la brushite (voir figure IV.14).

Les bandes de phosphates à 1125,02 ; 1049,47 et 984,94 cm⁻¹, ainsi que les bandes de valence d'eau à 3534,22 et 3475,38 cm⁻¹, identifiées dans le spectre IR illustré dans la figure IV.14, sont attribuées à la brushite. L'élargissement de la bande à 1049 cm⁻¹ attribué à la présence d'une faible quantité de phosphate de calcium amorphe PACC. L'épaulement à 600 cm⁻¹ indique la présence des traces de carapatite

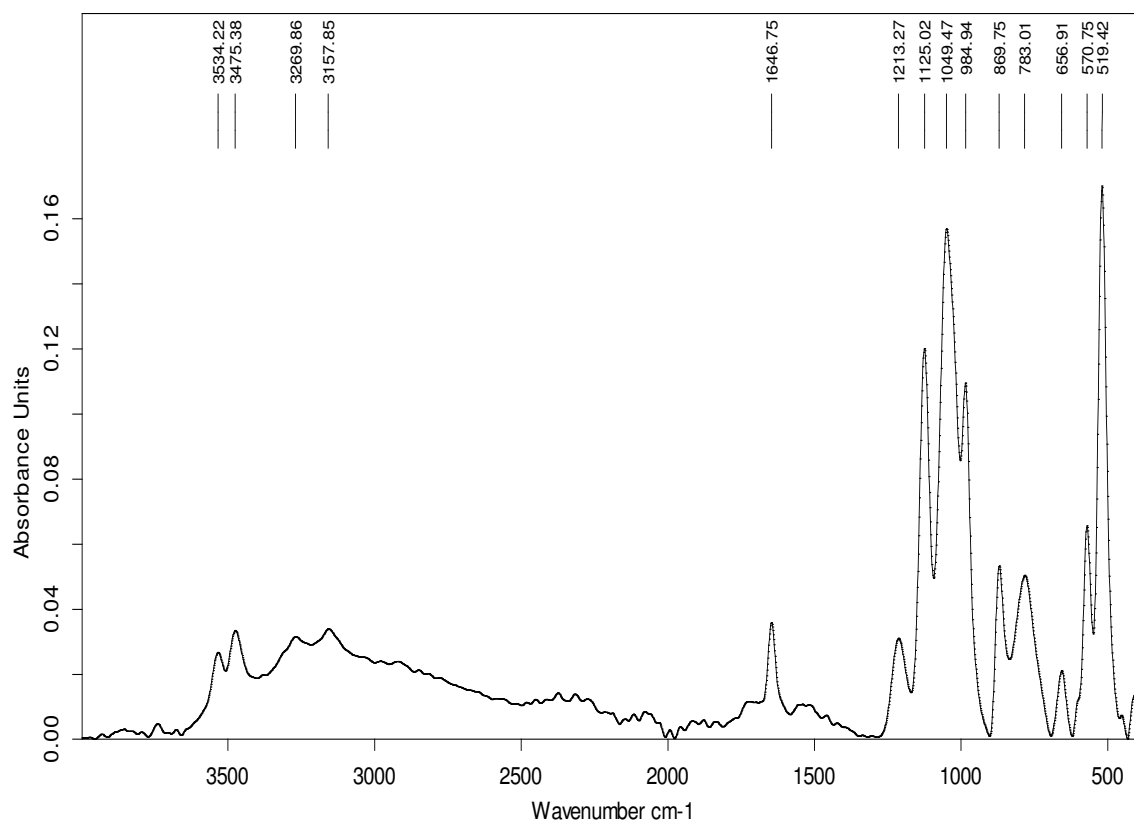
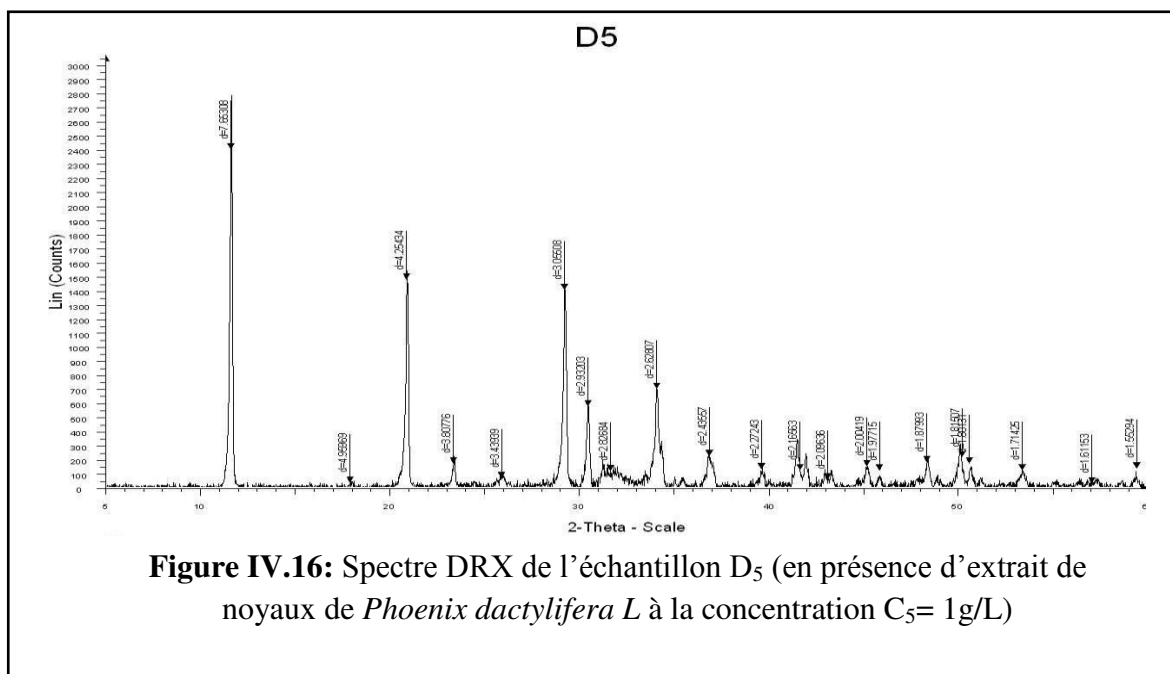
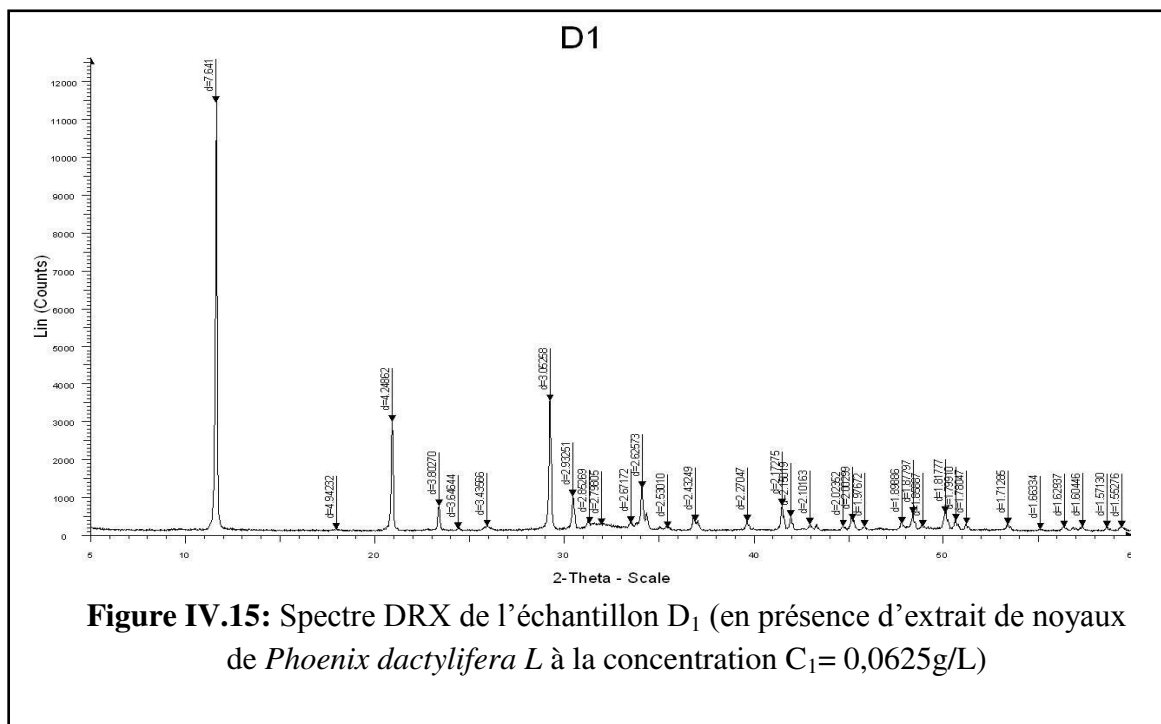


Figure IV.14: Spectre IR de l'échantillon D₅ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration C₅=1g/L)

II.3.2.3.1.b Analyse par diffraction aux rayons X (DRX)

Les précipités obtenus après filtration du mélange réactionnel de la cristallisation de la brushite en présence d'extrait de noyaux de dattes à des concentrations C₁ et C₅ ont été analysés par diffraction des rayons X (DRX) pour confirmer les phases cristallines formées à la fin de l'expérience (voir figure VI.15 et figure IV.16). Il apparaît que pour les deux précipités formés aux deux concentrations choisies, il s'agit de la brushite.



II.3.2.3.2 Etude de l'effet des extraits aqueux de *Trigonella foenum* (le fenugrec) sur la cristallisation de la brushite

Le Fenugrec (*Trigonella foenum*) est une épice très connue. Elle est utilisée souvent comme stimulante de l'appétit. Elle est testée par ses propriétés diurétiques.

En présence de l'extrait de *Trigonella foenum*, aux différentes concentrations testées, les courbes conductimétriques obtenues ont toutes l'allure de la courbe de référence.

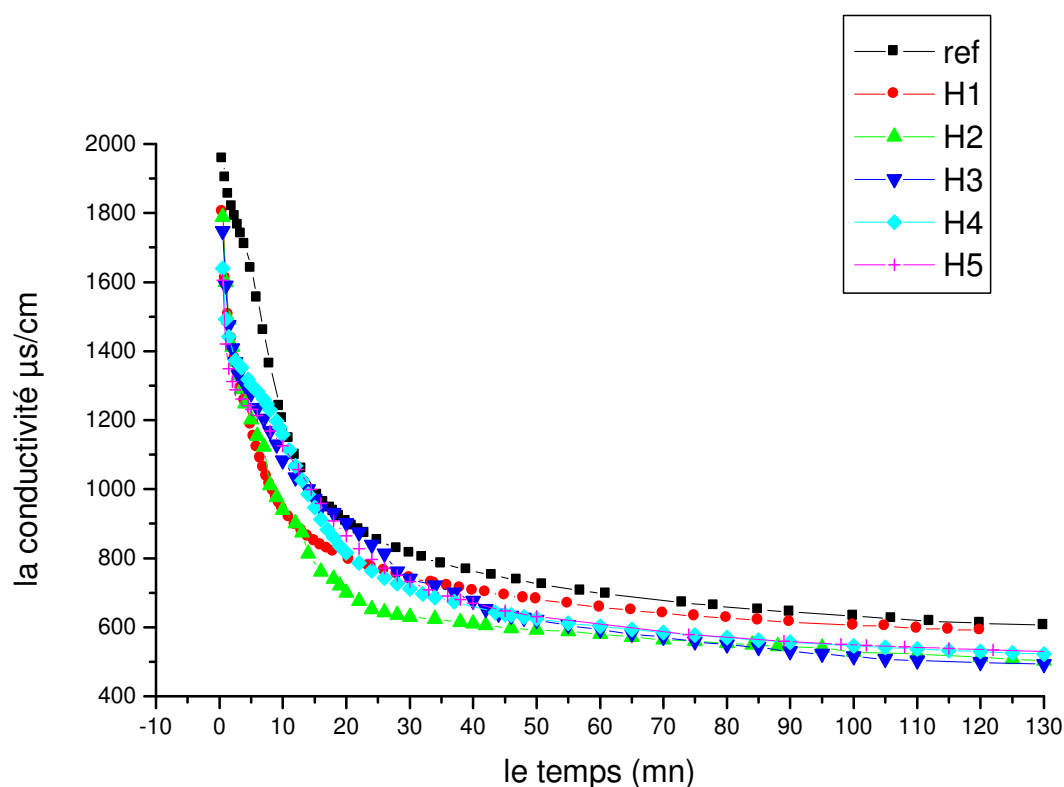


Figure IV.17: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits de *Trigonella foenum*.

Pour chaque concentration de l'extrait de *Trigonella Foenum*, le test est répété 6 fois, nous en déduisons la moyenne des pentes, le coefficient de variation CV(<10%) et le taux d'inhibition. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV.4.

Tableau IV.4 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence de Fenugrec.

Essai	ΔT mn	Pente	R^2	p	CV %	Inhibition %
Sans inhibiteur	0,5-15,5	-74,625	0,994	<0,0001		
H ₁ (0,0625) g/L	2-9,5	-62,746	0,9907	<0,0001	5,1	15,92%
H ₂ (0,125) g/L	2-10	-58,3081	0,9936	<0,0001	5,3	21,87%
H ₃ (0,25) g/L	2-16	-31,9887	0,9925	<0,0001	6	57,71%
H ₄ (0,5) g/L	2,5-24	-32,2533	0,9915	<0,0001	5,8	56,78%
H ₅ (1) g/L	2-28	-22,6568	0,9962	<0,0001	4,9	69,64%

Issus des résultats, il apparaît que le temps d'induction de la croissance des cristaux de la brushite a augmenté en présence des extraits de fenugrec (de 0,5 mn à 2,5 mn), il s'ensuit un retard à la croissance des cristaux de brushite. D'autre part, le pourcentage d'inhibition augmente en fonction de la concentration du fenugrec. En présence de l'extrait aqueux à 1g/L, le pouvoir inhibiteur du fenugrec est le plus élevé (soit 69,7%).

Aussi, nous observons qu'en présence de la plante Fenugrec, l'intervalle de la plage linéaire a augmenté. Ceci se traduit par un retard à l'agrégation des cristaux de brushite.

II.3.2.3.2.a Analyse par spectroscopie Infrarouge IRTF

◆ II.3.2.3.2.a.1Echantillon H₁: En présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₁=0,0625g/L.

Les bandes des phosphates à 1120,92 ; 1049,81 et 981,29 cm⁻¹, ainsi que les bandes de valence d'eau à 3535,47 et 3471,97 cm⁻¹, identifiées dans le spectre IR illustré dans la figure IV.18, sont attribuées à la brushite. De même que l'allure du triplet (1120, 1049 et 981) cm⁻¹, révèle la présence d'un autre phosphate de structure hexagonale, à l'état de traces.

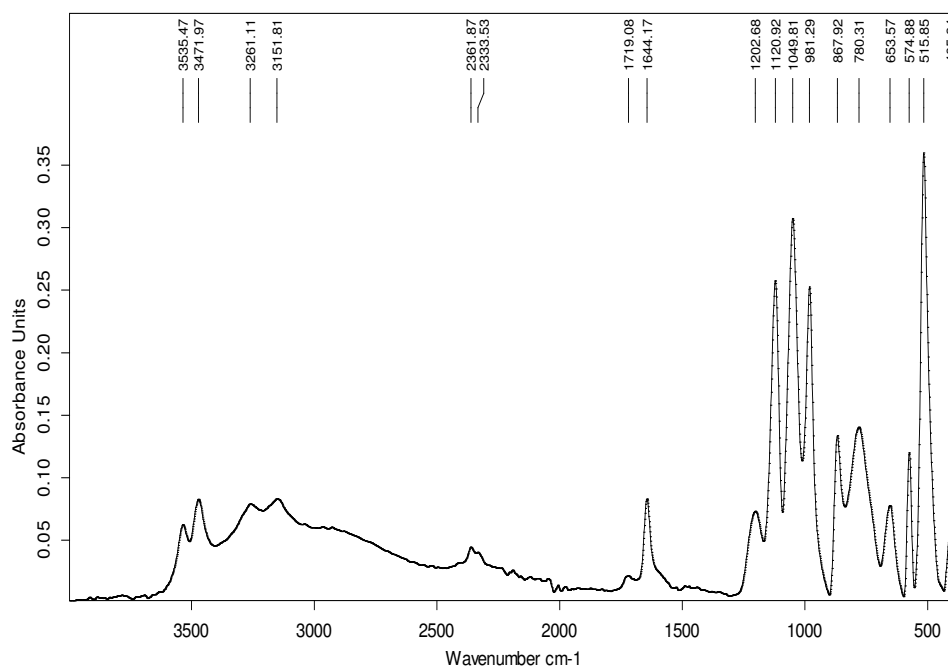


Figure IV.18: Spectre IR de l'échantillon H₁ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₁=0,0625g/L).

◆ II.3.2.3.2.a.2 Echantillon H₂ : En présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₂=0,125g/L.

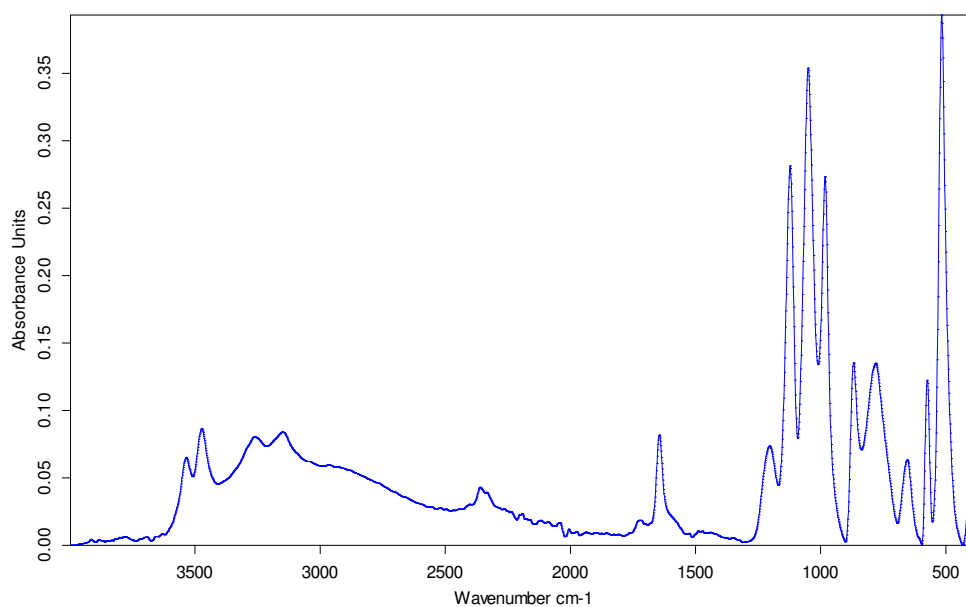


Figure IV.19: Spectre IR de l'échantillon H₂ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₂=0,125g/L).

Les bandes de valence des molécules d'eau à 3535,69 et 3473,30 cm^{-1} et les valences des phosphates à 1122,10 ; 1049,90 et 982,29 cm^{-1} (voir figure IV.19) confirme la cristallisation de la brushite associée à des traces d'apatite.

◆ **II.3.2.3.2.a.3 Echantillon H_3 : En présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration $C_3=0,25\text{g/L}$.**

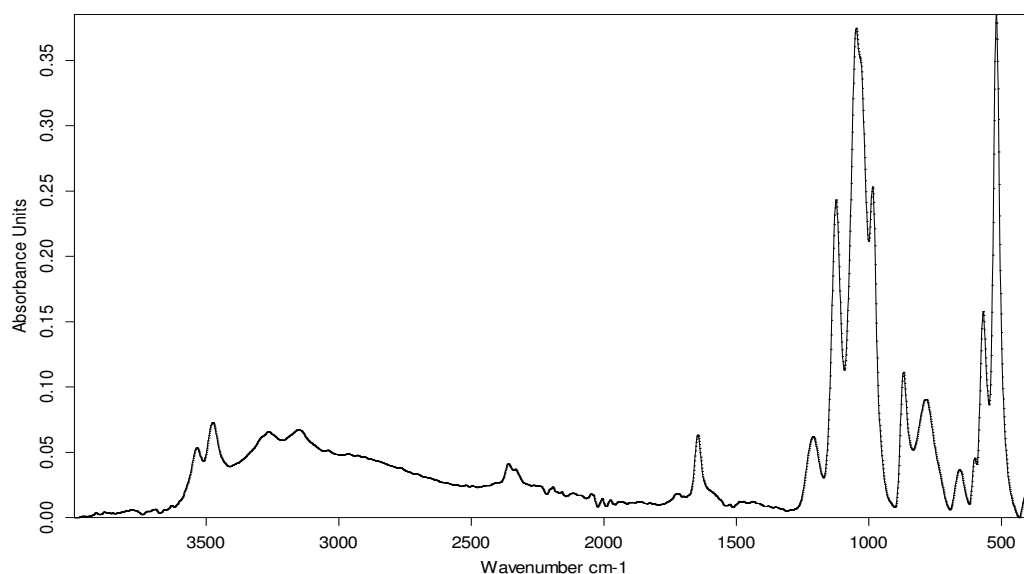


Figure IV.20: Spectre IR de l'échantillon H_3 (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration $C_3=0,25\text{g/L}$).

La cristallisation de la brushite s'est accompagnée de celle de la carapatite. En effet, le bifide à 3535,92 et 3475,84 cm^{-1} et le triplet à 1123,76 ; 1047,92 et 985,87 cm^{-1} confirme la cristallisation de la brushite. La présence d'une bande large asymétrique épaulée à 1047,92 cm^{-1} ainsi qu'un épaulement à 600 cm^{-1} indique la coexistence de la carapatite (voir figure IV.20).

◆ **II.3.2.3.2.a.4 Echantillon H_4 : En présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration $C_4=0,5\text{g/L}$.**

Le précipité recueilli à la fin de la cristallisation des phosphates calciques en milieu aqueux, a été soumis à l'analyse IRTF, afin de déterminer et confirmer la phase cristalline formée. Le spectre obtenu est illustré dans la figure IV.21.

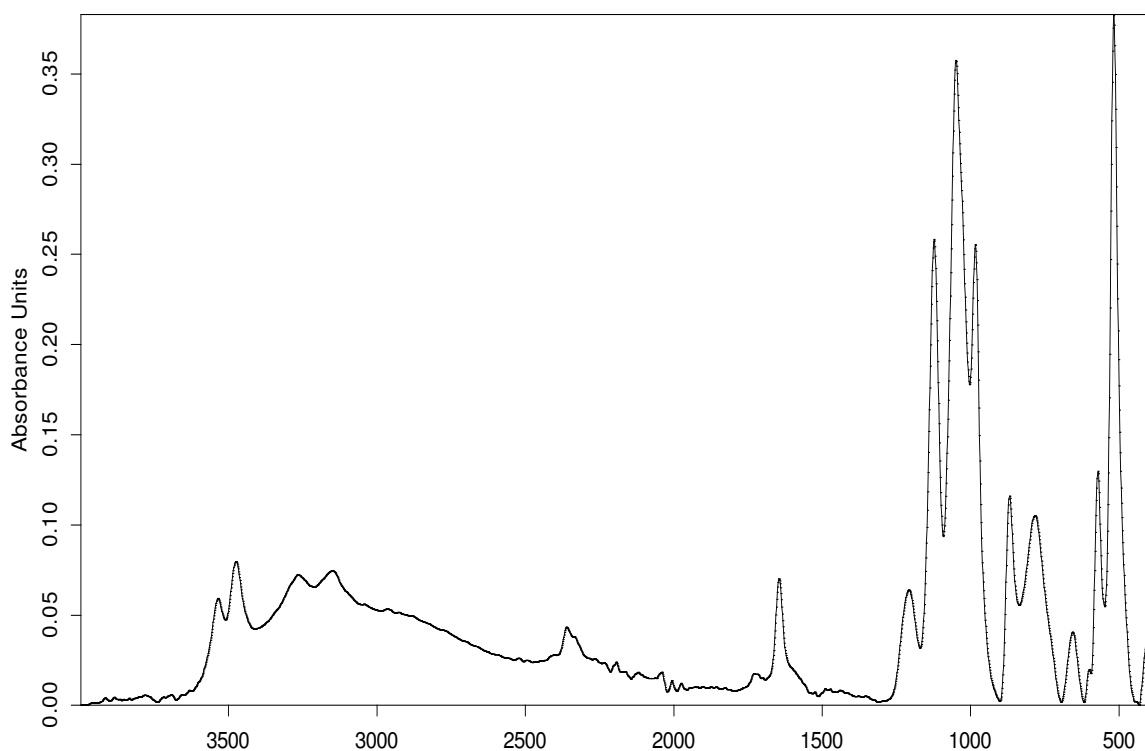


Figure IV.21: Spectre IR de l'échantillon H₄ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₄=0,5g/L).

Les bandes observées à 3535,56 et 3475,00 cm⁻¹ (valence des molécules d'eau) et à 1123,02 ; 1049,20 et 963,81 cm⁻¹ (valence des phosphates) ainsi que les bandes secondaire à 570,88 et 517,55 cm⁻¹ sont attribuées à la brushite, et la bande large asymétrique épaulée à 1049cm⁻¹ ainsi que un épaulement à 600 cm⁻¹ indique la coexistence de la carapatite (voir figure IV.21).

◆ **II.3.2.3.2.a.5 Echantillon H₅ : En présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₅=1g/L.**

L'analyse spectrale du précipité recueilli à la fin de l'expérience et l'identification avec les spectres de référence et la présence des bandes caractéristiques montrent que le composé formé était principalement la brushite associée à des traces de la carapatite (voir figure IV.22).

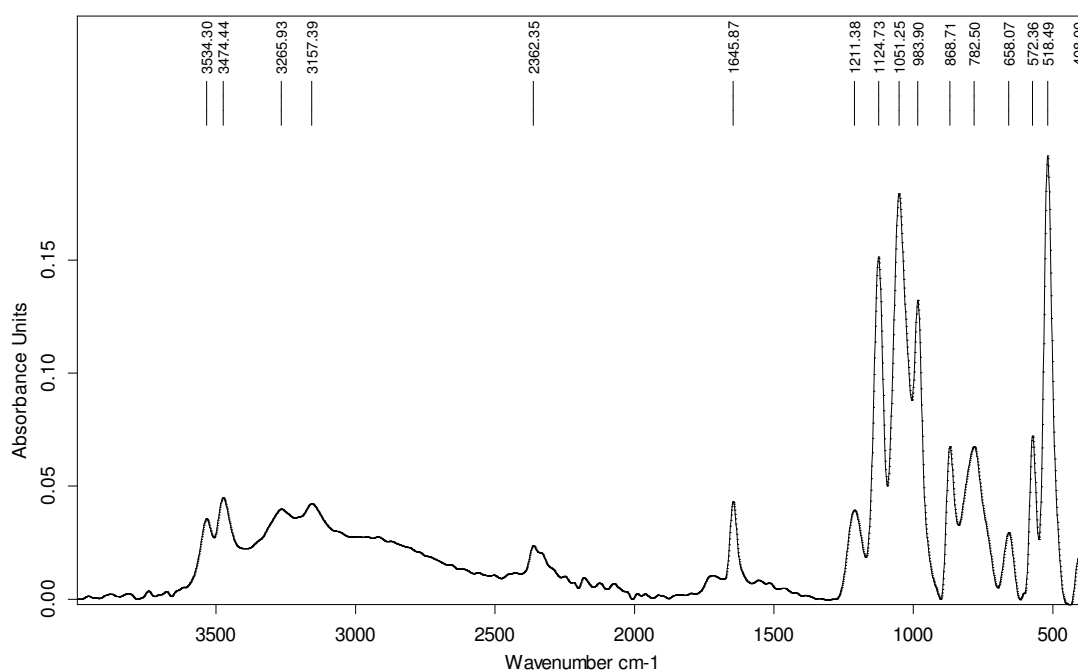
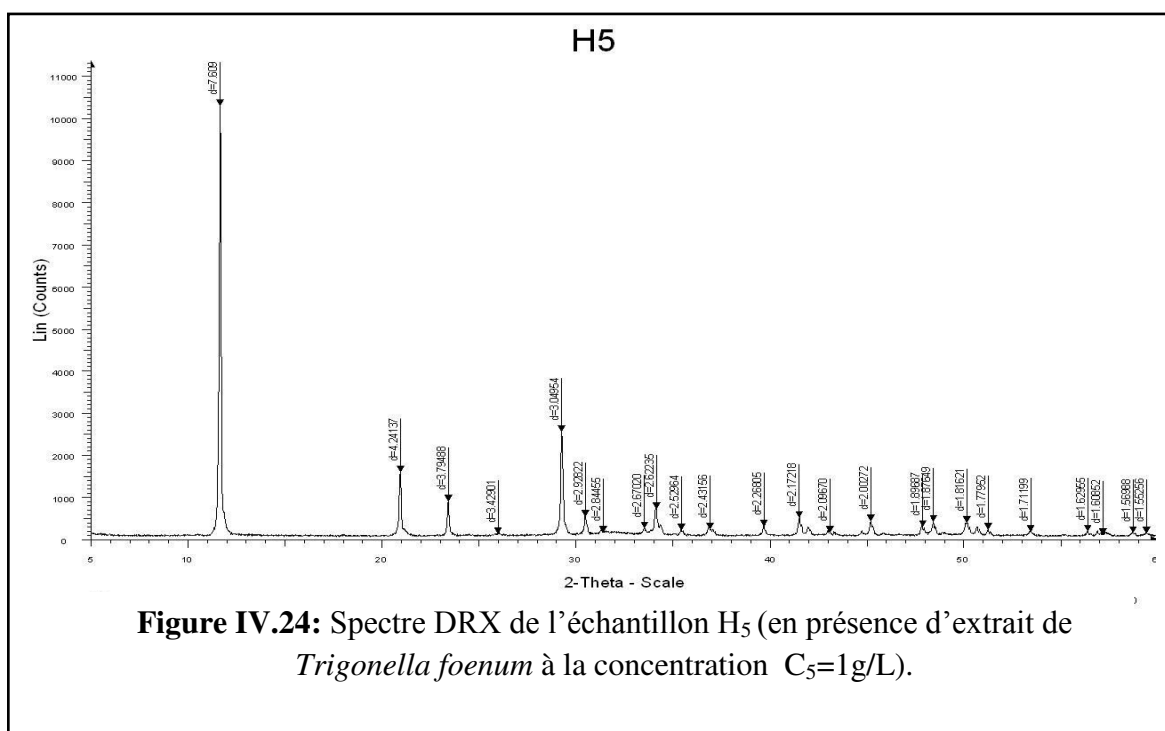
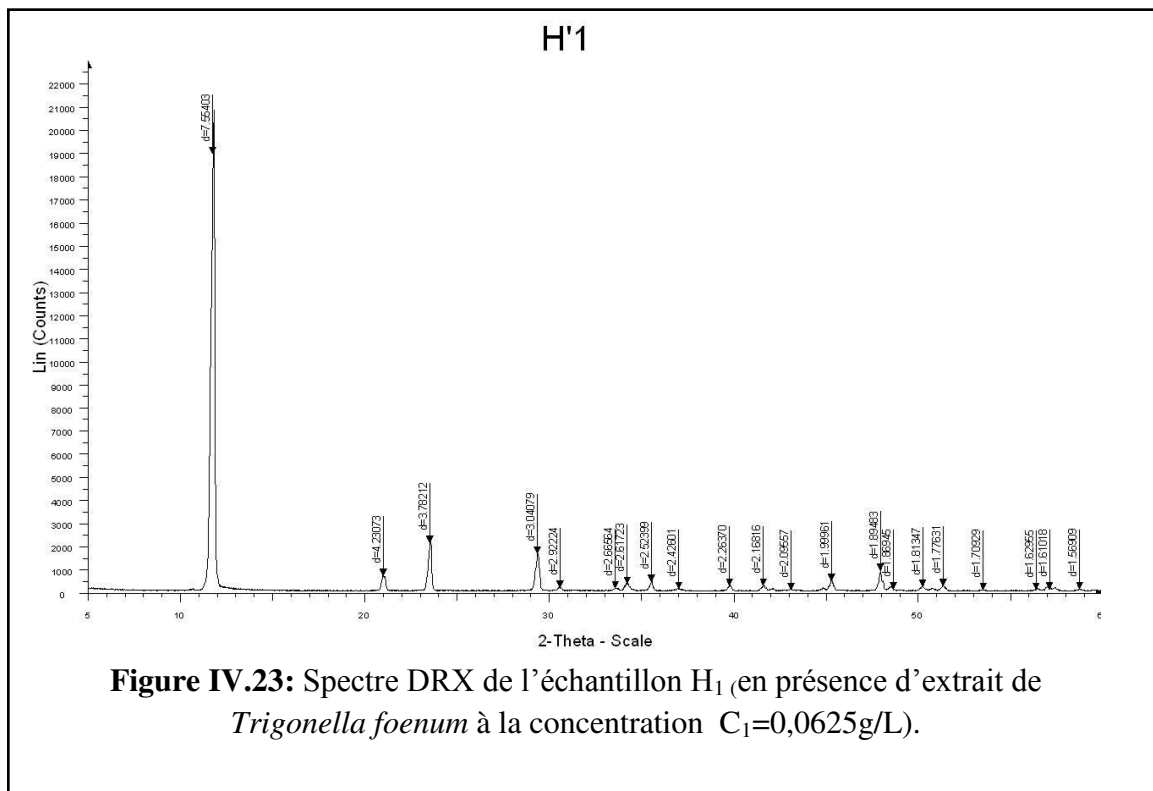


Figure IV.22: Spectre IR de l'échantillon H₅ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₅=1g/L).

En effet, la valence des molécules d'eau à 3534,30 et 3474,44 cm⁻¹ et la valence des phosphates à 1124,73 ; 1051,25 et 983,90 cm⁻¹, sont attribuées à la brushite. Un épaulement faible au voisinage de 600 cm⁻¹ indique la présence des traces de carbapatite.

II.3.2.3.2.b Caractérisation par Diffraction des rayons X (DRX)

Une analyse par diffraction des rayons X des solides recueillis à la fin des expériences a été faite pour confirmer les phases cristallines formées. Ces résultats confirment la formation des cristaux de brushite (voir figure IV.23 et figure IV.24).



II.3.2.3.3 Etude de l'effet des extraits aqueux de *Cerasus vulgaris* (queues de cerise) sur la cristallisation de la brushite

Les queues de cerise « *Cerasus vulgaris* » sont connus pour leurs vertus diurétiques et anti-inflammatoires, largement démontrées in vivo (Hooman et al, 2009). Le traitement avec un extrait de queues de cerise fait augmenter le volume des urines (diurèse) et diminuer la concentration en électrolytes, excepté le potassium. Les queues de cerise sont extrêmement riches en flavonoïdes et en sels de potassium qui sont à l'origine de leur effet diurétique.

Dans les mêmes conditions expérimentales décrites précédemment à l'étude de la cristallisation de la brushite, nous avons suivi la cinétique de cristallisation des phosphates et nous avons étudié l'action inhibitrice de certaines concentrations d'extraits de queues de cerises sur la précipitation de la brushite. Les concentrations de l'extrait aqueux de cette plante testées varient entre 0,0625 et 1 g/L. Les courbes conductimétriques obtenues dans l'intervalle des concentrations choisi de l'extrait de cette plante sont illustrées dans la figure IV.25

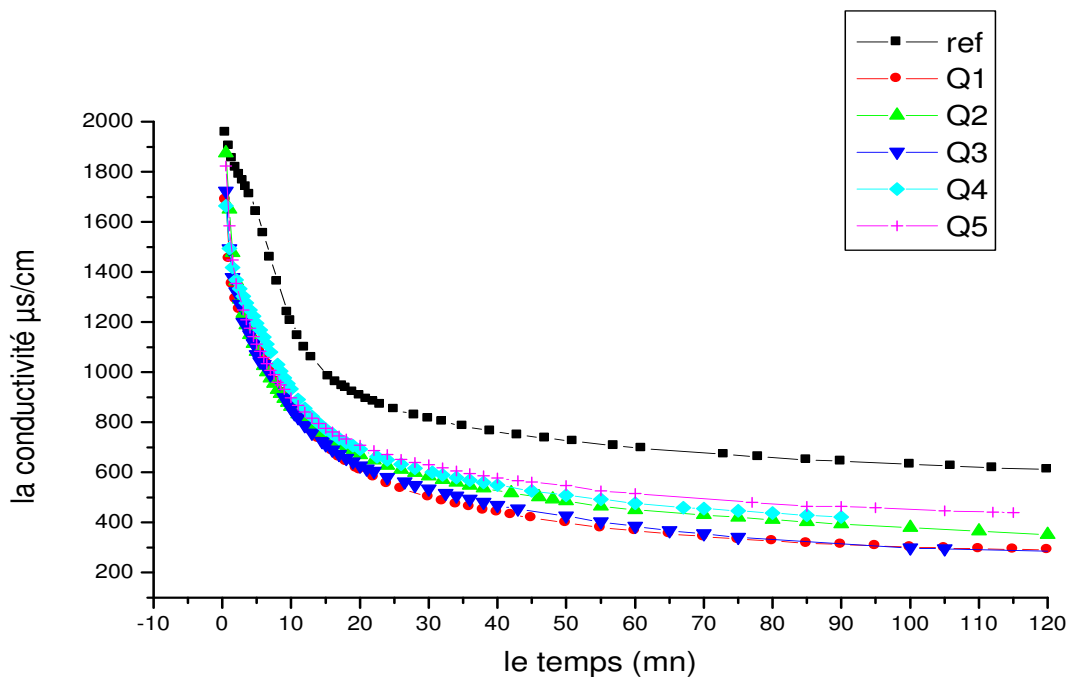


Figure IV.25: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits des queues de *Cerasus vulgaris*.

Les courbes conductimétriques obtenues aux différentes concentrations testées des extraits aqueux, ont toutes l'allure de la courbe conductimétrique obtenue en absence de cette plante (courbe de référence). Pour chaque extrait aqueux de queues de cerises, le teste est répété 6 fois et nous en déduisons, la moyenne des pentes et le coefficient de variation CV qui doit être <10%.

Les paramètres cinétiques ainsi obtenus sont comparés avec ceux déterminés précédemment en absence d'extrait de plante (échantillon de référence).

Les résultats trouvés sont illustrés dans le tableau IV.5

Tableau IV.5 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence des extraits aqueux de *Cerasus vulgaris*.

Essai	ΔT	Pente	R^2	Erreur	CV %	Inhibition %
Sans inhibiteur	0,5-15,5	-74,625	0,994	<0,0001	6	
Q ₁ (0,0625) g/L	2-18	-40,6992	0,9903	<0,0001	4,2	45,47%
Q ₂ (0,125) g/L	3-10	-51,9357	0,9900	<0,0001	3,9	30,40%
Q ₃ (0,25) g/L	3-15	-41,8202	0,9900	<0,0001	4,3	43,95%
Q ₄ (05) g/L	2-14	-49,2503	0,9951	<0,0001	3,5	33,99%
Q ₅ (1) g/L	3-10	-50,2461	0,9915	<0,0001	3,8	32,67%

Issus des résultats, les extraits aqueux de la plante retardent et réduisent la croissance cristalline du phosphate calcique. Le pouvoir inhibiteur de *Cerasus vulgaris* sur la cristallisation de la brushite, est modéré. En effet, le pourcentage d'inhibition varie entre 30% et 45%.

II.3.2.3.3.a Analyse par spectroscopie Infrarouge IRTF

◆ II.3.2.3.3.a.1 Echantillon Q₁ : En présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₁=0,0625g/L.

L'analyse par IRTF du précipité obtenu à la fin de la cristallisation du phosphate, en présence d'extrait aqueux de queues de cerises à la concentration C₁= 0,0625 g/L confirme que l'espèce cristalline formée était la brushite, associée à de l'apatite à l'état de traces (voir la figure IV.26).

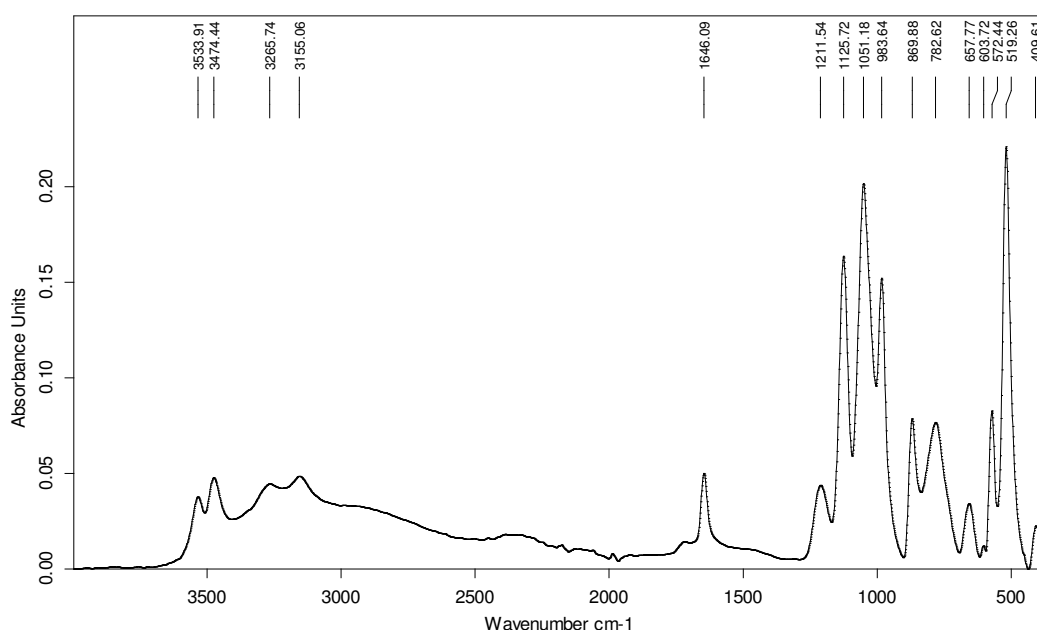


Figure IV.26: Spectre IR de l'échantillon Q₁ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₁=0,0625g/L).

En effet, Le spectre IR de l'échantillon Q₁ montre des bandes caractéristiques de la brushite. En effet, on note la valence des molécules d'eau à 3533,91 et 3474,44 cm⁻¹, la vibration de valence des phosphates P=O à 1124,72 ; 1051,18 et 983,64 cm⁻¹ et des bandes secondaire à 572,44 et 519,26 cm⁻¹. Une petite bande fine à 603,72 est attribuée à la présence de traces de carapatite.

◆ II.3.2.3.a.2 Echantillon Q₂ : En présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₂=0,125g/L.

Après le suivi cinétique de la cristallisation de la brushite en présence d'extrait de queues de cerises à C₂= 0,125 g/L, le précipité blanc obtenu après filtration a été analysé par spectroscopie IRTF.

Le spectre IRTF obtenu pour l'échantillon Q₂ (voir figure IV.27) montre que l'espèce phosphatique cristallisée est la brushite. Il comporte des fréquences caractéristiques de brushite (bifide à 3533,32 et 3474,11 cm⁻¹, triplet à 1125,37 ; 1051,42 et 983,51 cm⁻¹). La carapatite est présente en trace dans cet échantillon (bande fine à 606,01 cm⁻¹).

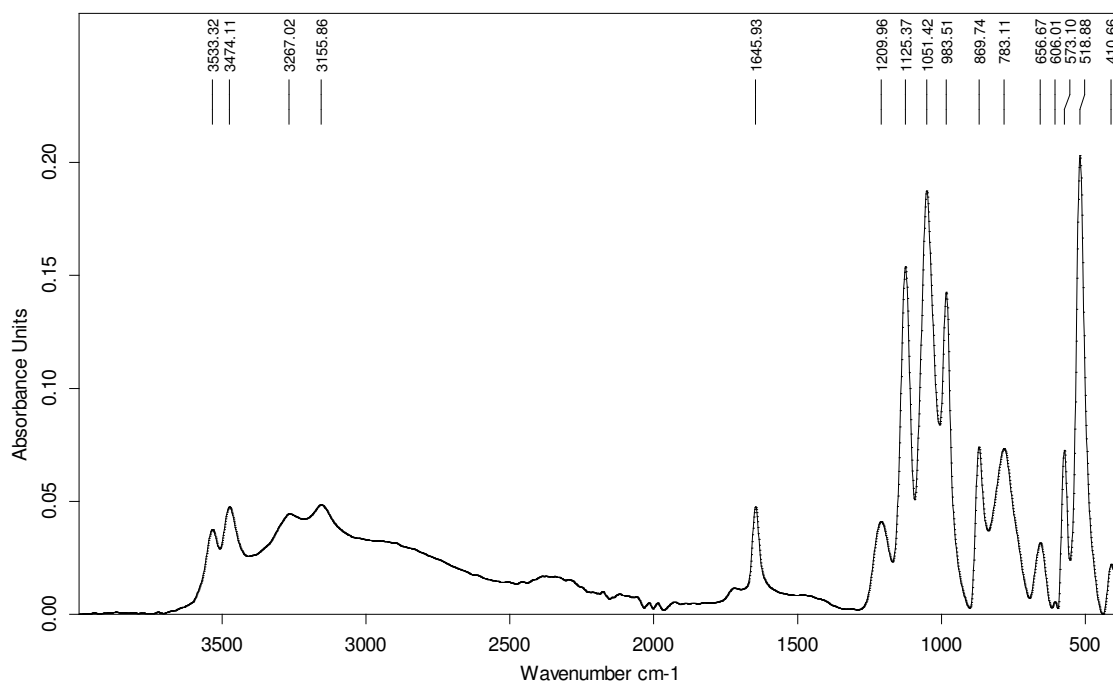


Figure IV.27: Spectre IR de l'échantillon Q₂ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₂=0,125g/L).

◆ II.3.2.3.a.3 Echantillon Q₃: En présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₃=0,25g/L.

L'analyse spectrale du solide blanc Q₃ recueilli à la fin de la cristallisation (en présence d'extrait aqueux à la concentration C₃= 0,25 g/L) et l'identification avec le spectre de référence montrent que le composé phosphatique formé est principalement la brushite (voir figure IV.28).

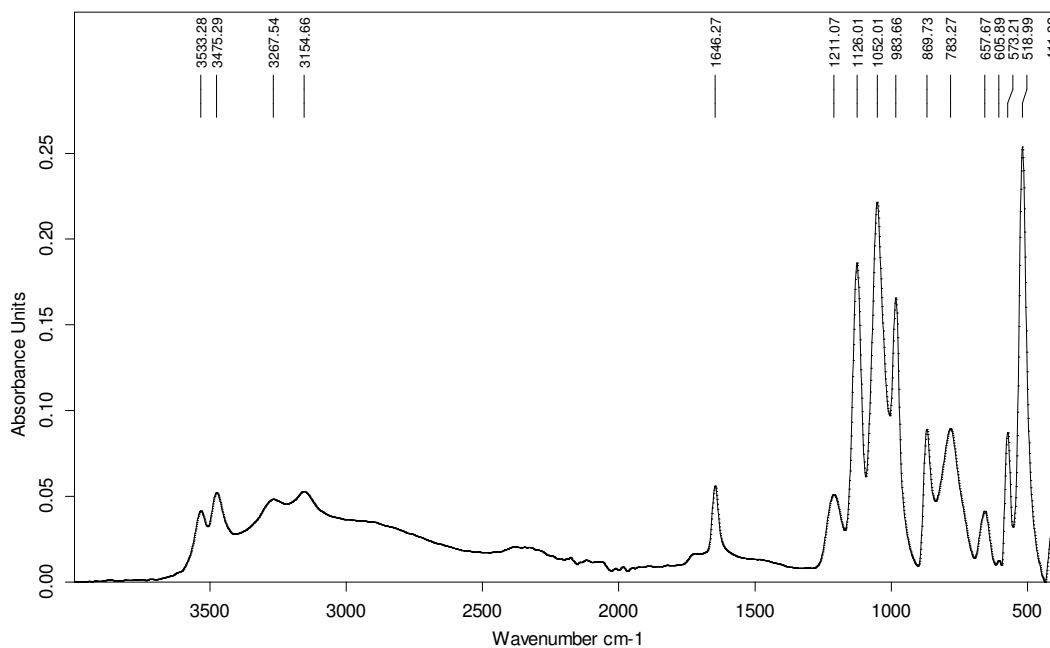


Figure IV.28: Spectre IR de l'échantillon Q₃ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₃=0,25g/L).

Le spectre obtenu par analyse spectroscopique donne l'ensemble des fréquences caractéristiques de l'espèce cristalline la brushite.

On note : les vibrations de valence des molécules d'eau à 3533,28 et 3475,29 cm⁻¹, les vibrations de valence des phosphates à 1126,01 ; 1052,01 et 983,66 cm⁻¹ et valence de la forme acide de phosphate (H-O)-P=O à 573,21 et 518,99 cm⁻¹. Une petite bande fine à 605,89 est attribuée à la présence de traces de carbapatite.

◆ II.3.2.3.a.4 Echantillon Q₄ : En présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₄=0,5g/L.

Pour identifier les phases cristallines formées à la fin de l'expérience, nous avons analysé le précipité obtenu par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Le spectre IRTF obtenu pour l'échantillon Q₄ (voir figure IV.29), montre les bandes caractéristiques de la brushite. Il comporte des fréquences caractéristiques des phosphates à 1125,98 ; 1051,20 et 983,26 cm⁻¹ et des molécules d'eau à 3533,16 et

3475,16 cm⁻¹. La bande fine (très faible) à 605,79 cm⁻¹, confirme la présence des traces de carbapatite.

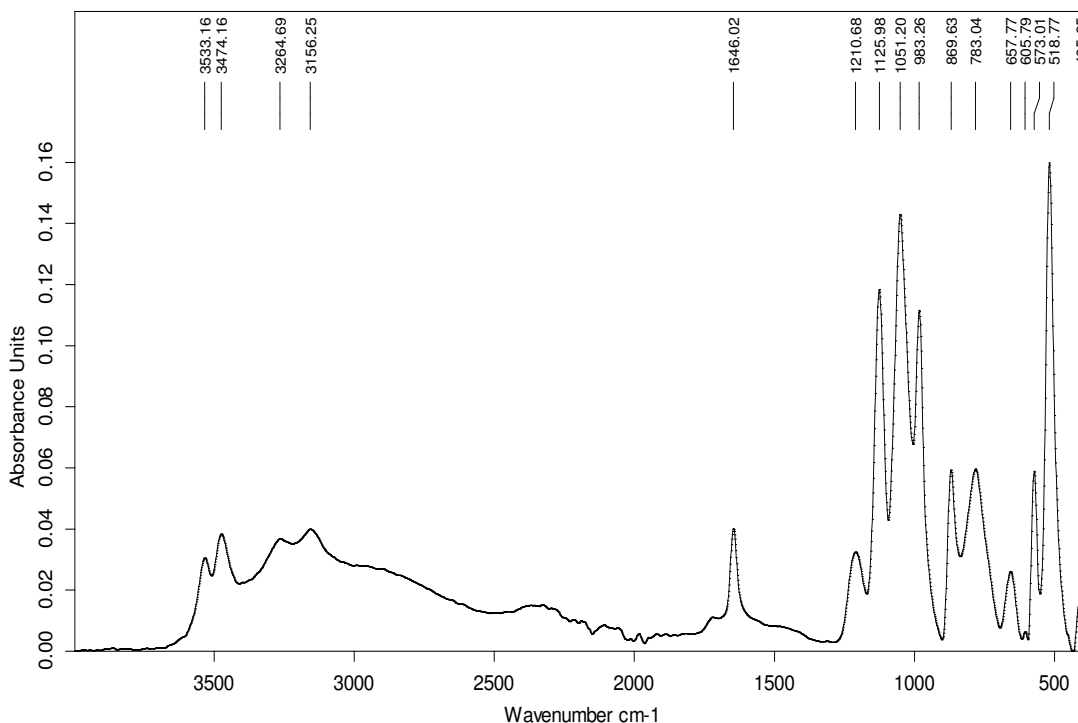


Figure IV.29: Spectre IR de l'échantillon Q₄ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₄=0,5g/L).

◆ **II.3.2.3.a.5 Echantillon Q₅ : En présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₅=1g/L.**

L'analyse spectrale du précipité blanc Q₅ recueilli à la fin de l'expérience (en présence d'extrait aqueux à la concentration C₅= 1 g/L) montre que les cristaux phosphatiques formés sont la brushite (voir figure IV.30).

Le spectre IR obtenu par analyse spectroscopique de l'échantillon Q₅ donne l'ensemble des bandes caractéristiques qui confirment la précipitation de l'espèce cristalline brushite (valence des molécules d'eau à 3532,91 et 3475,17 cm⁻¹ et valence des phosphates à 1126,32 ; 1051,62 et 983,74 cm⁻¹. La coexistence de la carbapatite, à l'état de traces, est identifiée par la présence d'une bande fine très faible à 604,95 cm⁻¹.

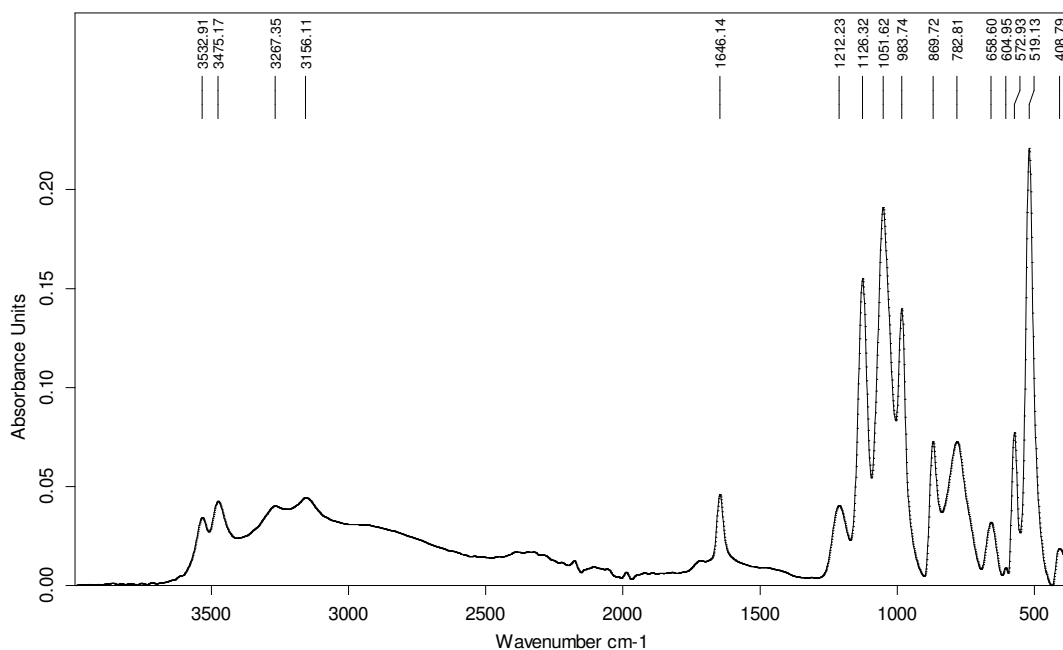
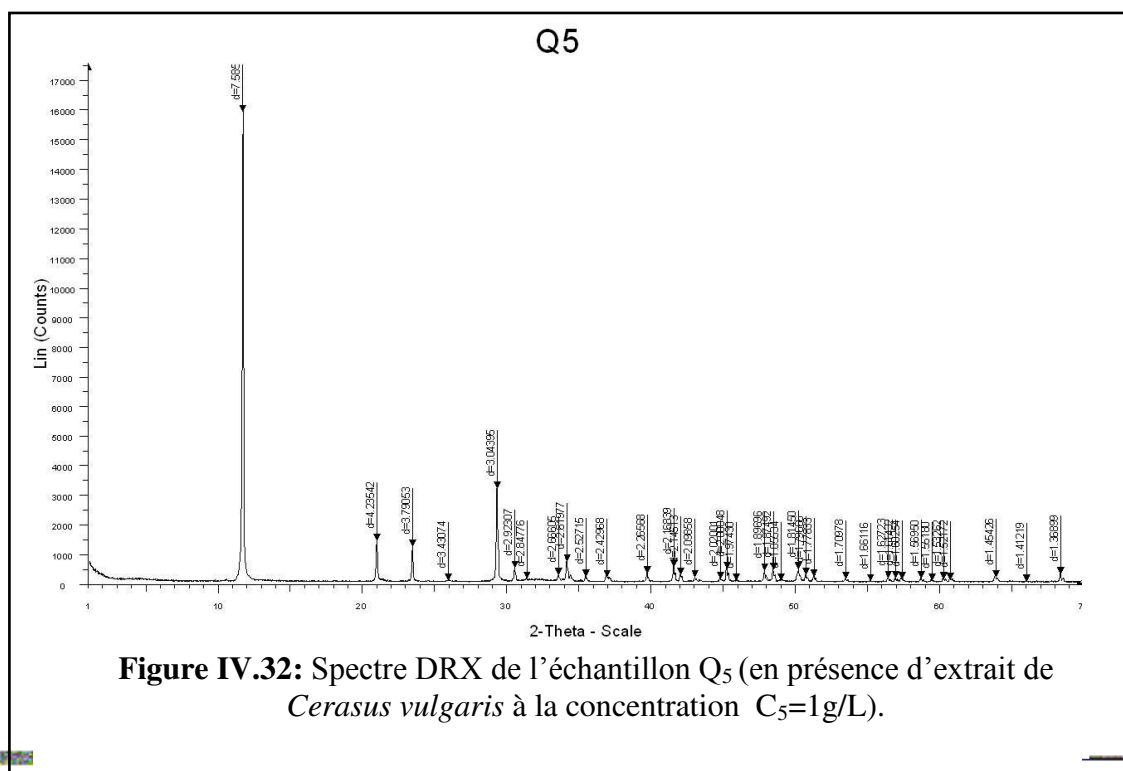
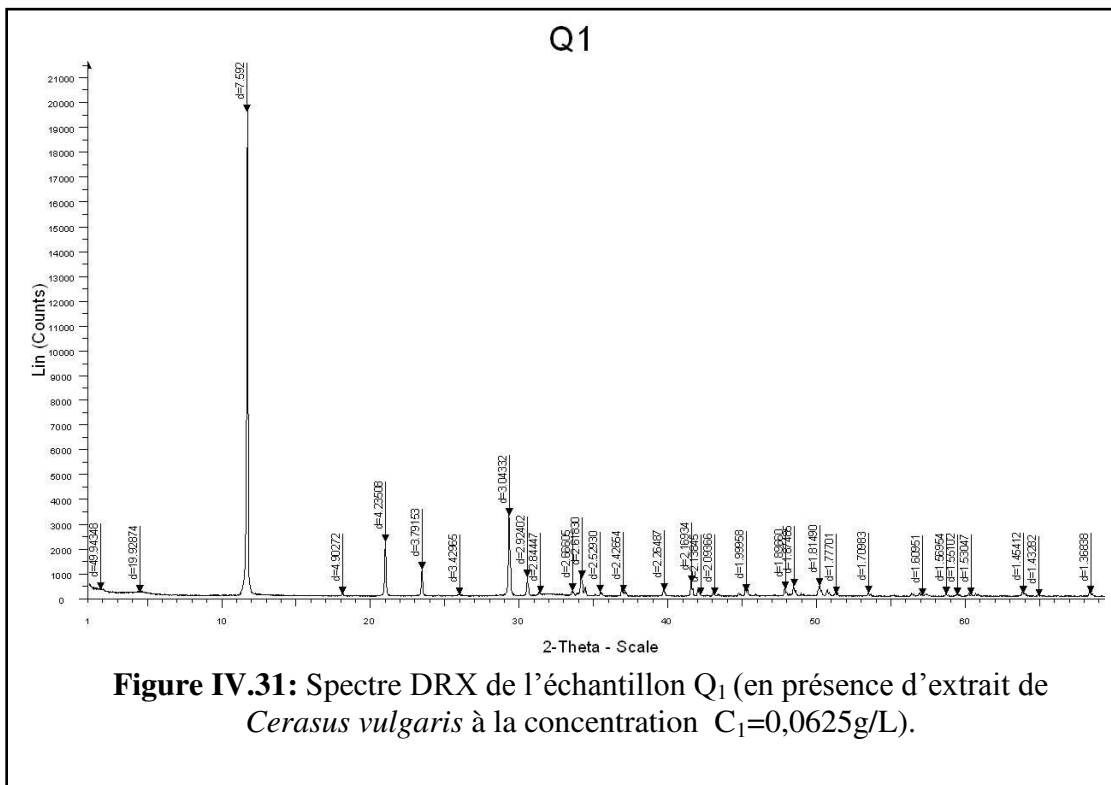


Figure IV.30: Spectre IR de l'échantillon Q₅ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₅=1g/L).

II.3.2.3.3.b Analyse par Diffraction des rayons X (DRX)

Afin de confirmer la nature chimique de l'espèce phosphatiques recueillie à la fin des tests, une deuxième méthode d'analyse spectroscopique a été utilisée. Les échantillons obtenus après le suivi cinétique de la cristallisation des phosphates calciques en présence d'extrait aqueux de la plante testée ont été analysés par la Diffraction des Rayons X (voir figure IV.31 et figure IV.32). L'ensemble des raies obtenues par cette analyse sont comparés avec ceux de référence. Les résultats confirment la formation des cristaux de brushite.



II.3.2.3.4 Etude de l'effet d'extraits de *Malus pumila* sur la cristallisation de la brushite.

La pomme est un fruit qui fournit des vitamines, des minéraux et oligo-éléments très variés. Egalement riche en fibres et en eau, elle contribue à un bon fonctionnement intestinal. On lui prête, entre autres, des vertus diurétiques, laxatives et antirhumatismales. La majorité des nutriments se trouvent directement sous la pelure du fruit, c'est pourquoi il est recommandé d'utiliser des infusions de pelures de pommes.

L'infusion de pelures de pommes de variété Golden à différentes concentrations (de 0,0625 à 1 g/L) sur la cristallisation des phosphates calciques a été testée dans le modèle conductimétrique. Pour chaque concentration d'extrait aqueux de cette plante, le test est répété 6 fois. Nous déterminons la pente conductimétrique, le coefficient de corrélation R et le coefficient de variation CV ($CV < 10\%$). En présence des extraits aqueux de cette plante, aux différentes concentrations testées, nous avons obtenu les courbes conductimétriques illustrées dans la figure IV.33.

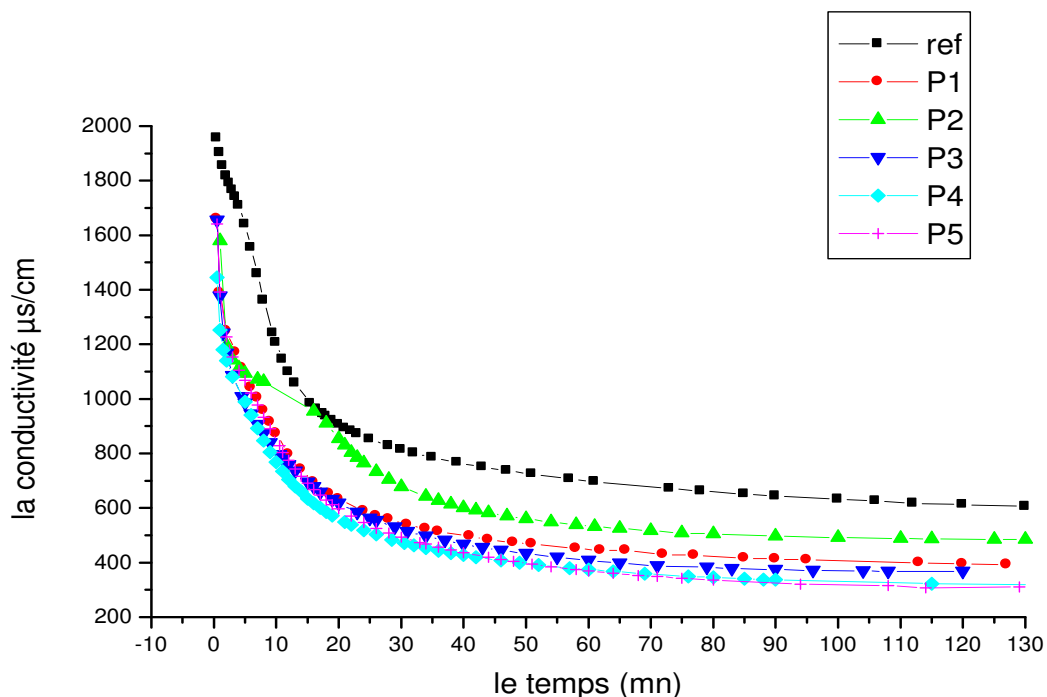


Figure IV.33: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits des pelures de *Malus pumila*.

Ces courbes de variation de la conductivité en fonction du temps obtenues pour les différentes concentrations testées ont toutes la même allure de la courbe de référence.

Les paramètres conductimétriques déterminés pour chaque concentration d'extrait testé sont résumés dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence des extraits de *Malus pumila*

Essai	ΔT	Pente	R^2	Erreur	CV %	Inhibition %
Sans inhibiteur	0,5-15,5	-74,625	0,994	<0,0001	6	
P ₁ (0.0625) g/L	2-16	-40,00	0,9924	<0,0001	4,8	46,39%
P ₂ (0.125) g/L	4-24	-17,28	0,999	<0,0001	3,9	76,84%
P ₃ (0.25) g/L	3-13	-34,24	0,9923	<0,0001	4,2	54,11%
P ₄ (0.5) g/L	2-15	-39,08	0,9902	<0,0001	4,4	47,62%
P ₅ (1) g/L	2-18	-37,21	0,9900	<0,0001	4,0	50,13%

II.3.2.3.4.a Analyse par spectroscopie Infrarouge IRTF

L'analyse par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier nous a permis d'identifier l'espèce cristalline formée à la fin de chaque expérience.

◆ II.3.2.3.4.a.1 Echantillon P₁ : En présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₁=0,0625g/L.

Après le suivi cinétique par conductimétrie de l'effet d'extrait aqueux de pelures des pommes sur la cristallisation des phosphates, le précipité obtenu P₁ est analysé par IRTF (voir figure IV.34).

Le spectre IR de l'échantillon P₁ montre des bandes caractéristiques de la brushite, comme composé principale. En effet, le doublet à 3532,57 et 3474,69 cm⁻¹ (valence des molécules d'eau) et le triplet à 1125,66 ; 1052,08 et 983,38 cm⁻¹ (valence des phosphates) ainsi que les bandes secondaire de phosphates à 573,24 et 518,98cm⁻¹ confirment la précipitation de la brushite. Une bande fine très faible à 605,29 cm⁻¹ montre la présence des traces de la carbapaptite.

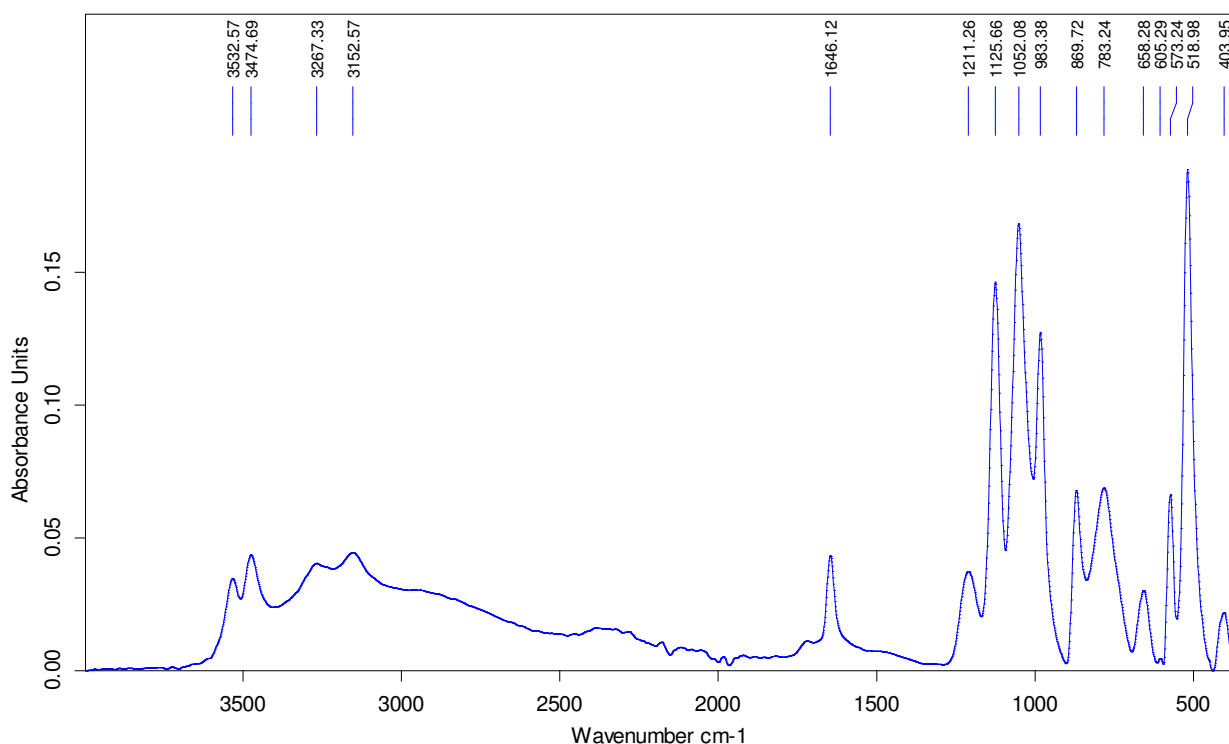


Figure IV.34: Spectre IR de l'échantillon P₁ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₁=0,0625g/L).

◆ **II.3.2.3.4.a.2 Echantillon P₂: En présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₂=0,125g/L.**

Les résultats obtenus par analyse microscopique IRTF de l'échantillon P₂ ont montré que le composé qui se forme était principalement la brushite (voir figure IV.35).

Les fréquences caractéristiques de la brushite sont observées sur le spectre IRTF de l'échantillon P₂ (valence des molécules d'eau à 3534,60 et 3476,89 cm⁻¹ et valence des phosphates P=O à 1125,88 ; 1050,60 et 985,12 cm⁻¹). Les épaulements à 1030 cm⁻¹ et à 601,10 cm⁻¹ sont contribués à la présence de la carapatite.

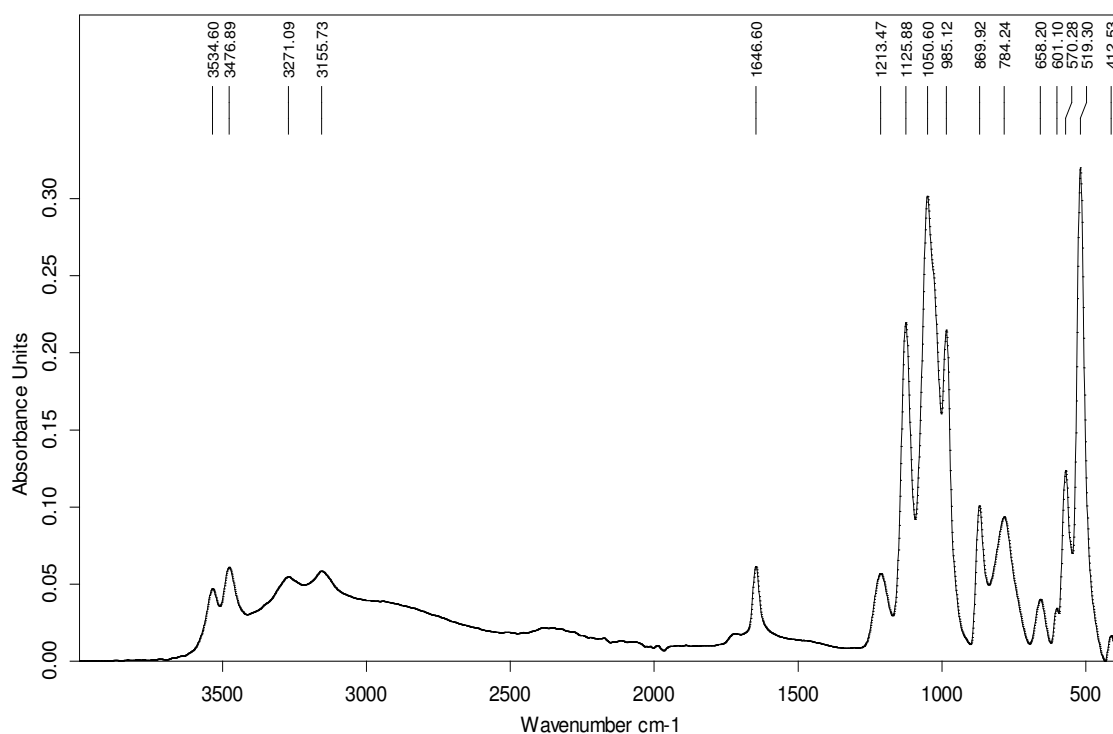


Figure IV.35: Spectre IR de l'échantillon P₂ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₂=0,125g/L).

◆ II.3.2.3.4.a.3 Echantillon P₃ : En présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₃=0,25g/L.

L'analyse spectrale IRTF du composé recueilli à la fin de l'expérience et l'identification avec les spectres de références confirment la formation de la brushite (voir figure IV.36).

Le spectre IRTF de l'échantillon P₃ comporte les fréquences caractéristiques des phosphates et des molécules d'eau. On note la valence des molécules d'eau à 3534,55 et 3476,30 cm⁻¹ et la valence des phosphates à 1125,87 ; 1049,18 et 985,41 cm⁻¹. On note aussi la présence de la carapatite en quantité très faible (des épaulements à 1030 et 601,58 cm⁻¹).

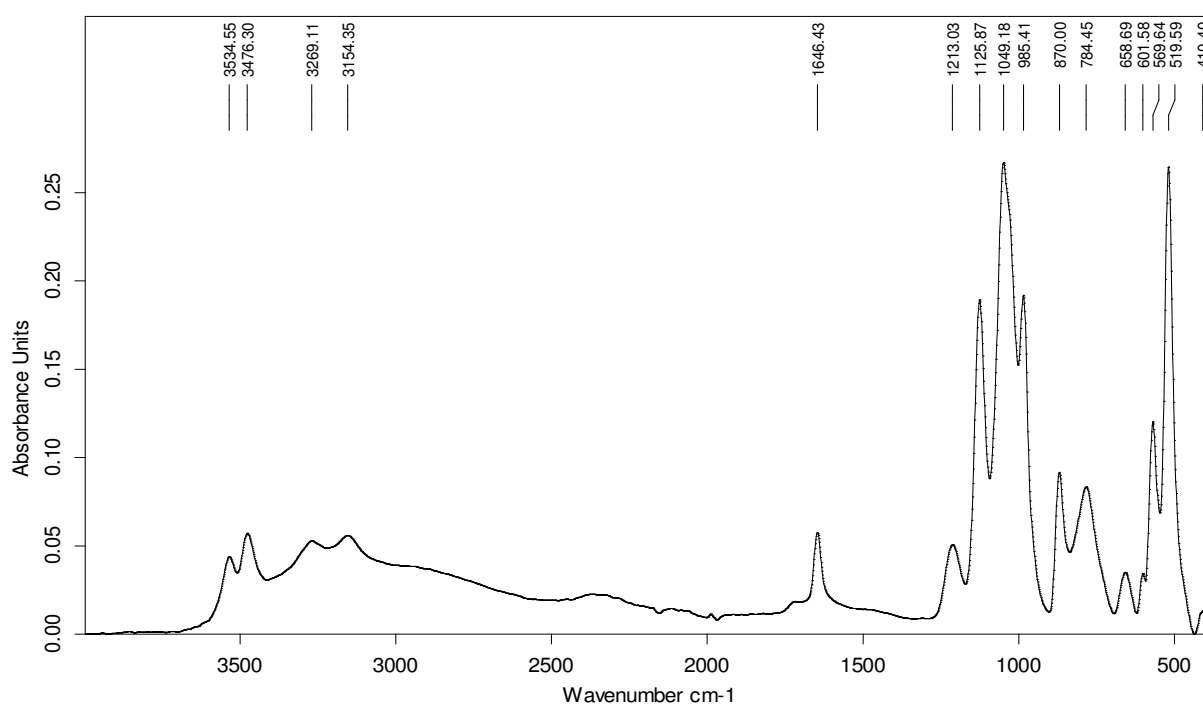


Figure IV.36: Spectre IR de l'échantillon P₃ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₃=0,25g/L).

◆ **II.3.2.3.4.a.4 Echantillon P₄ : En présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₄=0,5g/L.**

Pour déterminer et confirmer les phases cristallines qui se forment à la fin de la cristallisation, nous avons analysé l'échantillon obtenu P₄ par la spectroscopie Infrarouge IRTF (voir figure IV.37).

Les résultats spectraux de l'échantillon P₄ confirme la précipitation de l'espèce phosphatique la brushite. En effet, on note la présence d'un doublet à 3534,80 et 3477,06 cm⁻¹ (valence d'eau) et un triplet à 1126,22 ; 1051,73 et 984,48 cm⁻¹ (valence des phosphates). Une autre observation, est la présence d'une bande fine très faible à 602,34 cm⁻¹ due à l'existence des traces de la carapatite.

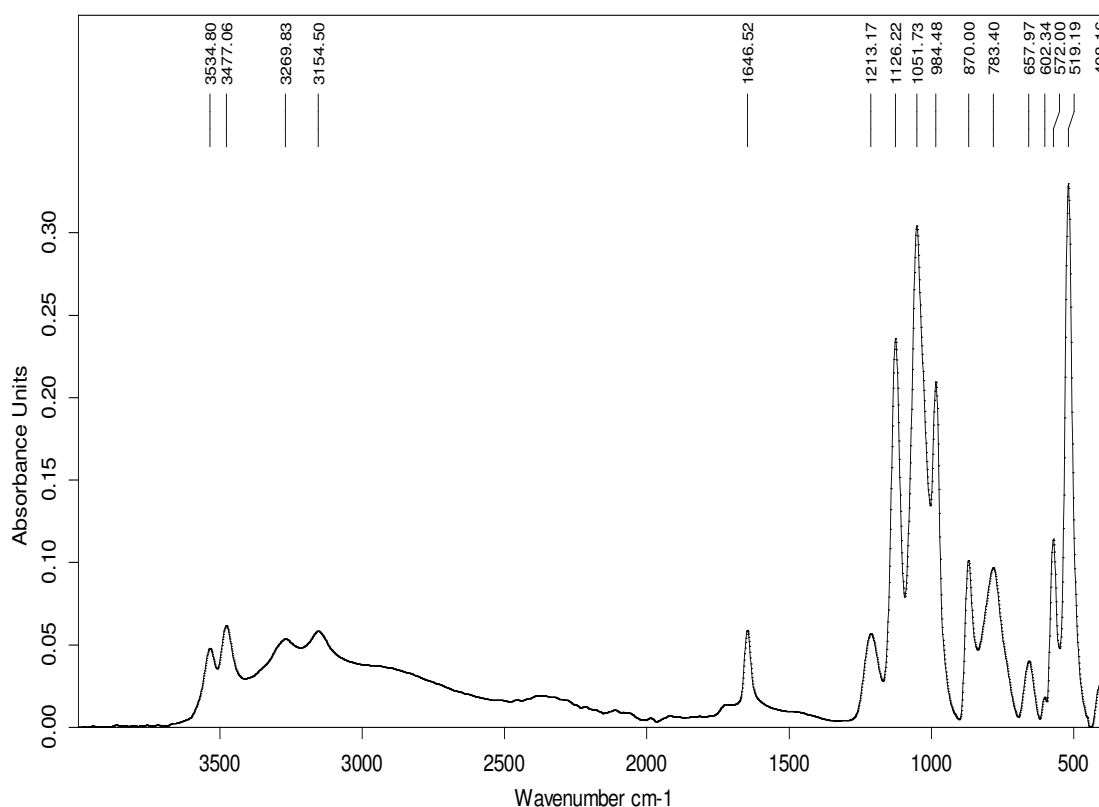


Figure IV.37: Spectre IR de l'échantillon P₄ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₄=0,5g/L).

◆ II.3.2.3.4.a.5 Echantillon P₅ : En présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₅=1g/L.

L'identification de l'espèce phosphatique cristallisable à la fin de test est faite par une analyse spectroscopique IRTF (voir figure IV.38).

La comparaison du spectre IR de l'échantillon P₅ obtenu avec les spectres de référence, montre que les cristaux formés à la fin de l'expérience sont de la brushite.

Les principales fréquences de vibration de la brushite sont : un doublet à 3534,31 et 3475,97 cm⁻¹ (valence d'eau) et un triplet à 1126,91 ; 1051,46 et 984,33 cm⁻¹ (valence des phosphates). La cristallisation de la brushite s'est accompagnée de la précipitation de traces de carapatite, identifiée par une bande fine à 601,83 cm⁻¹.

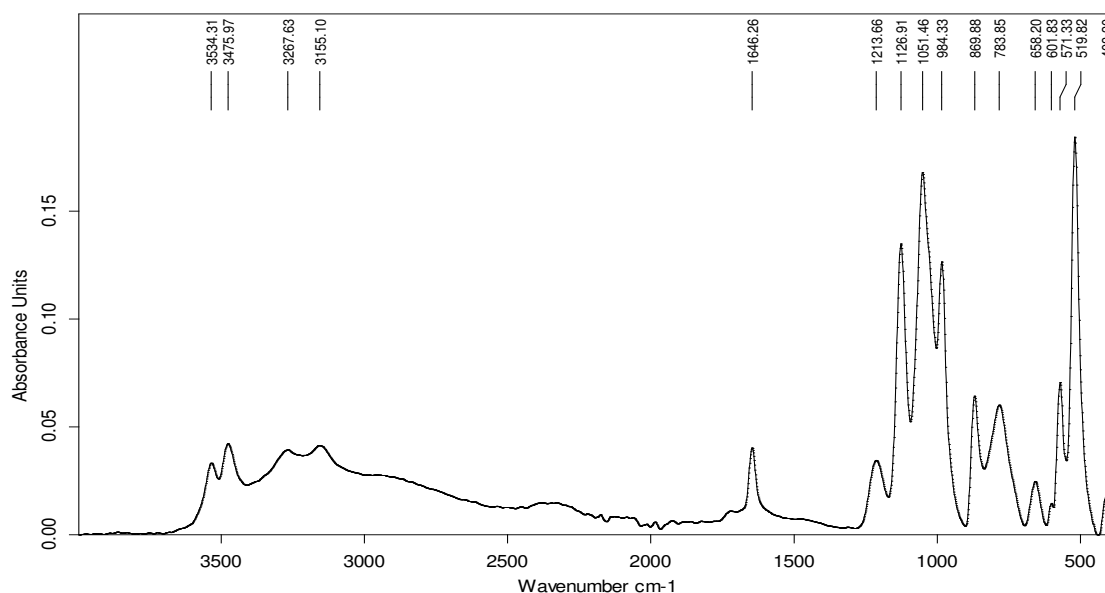


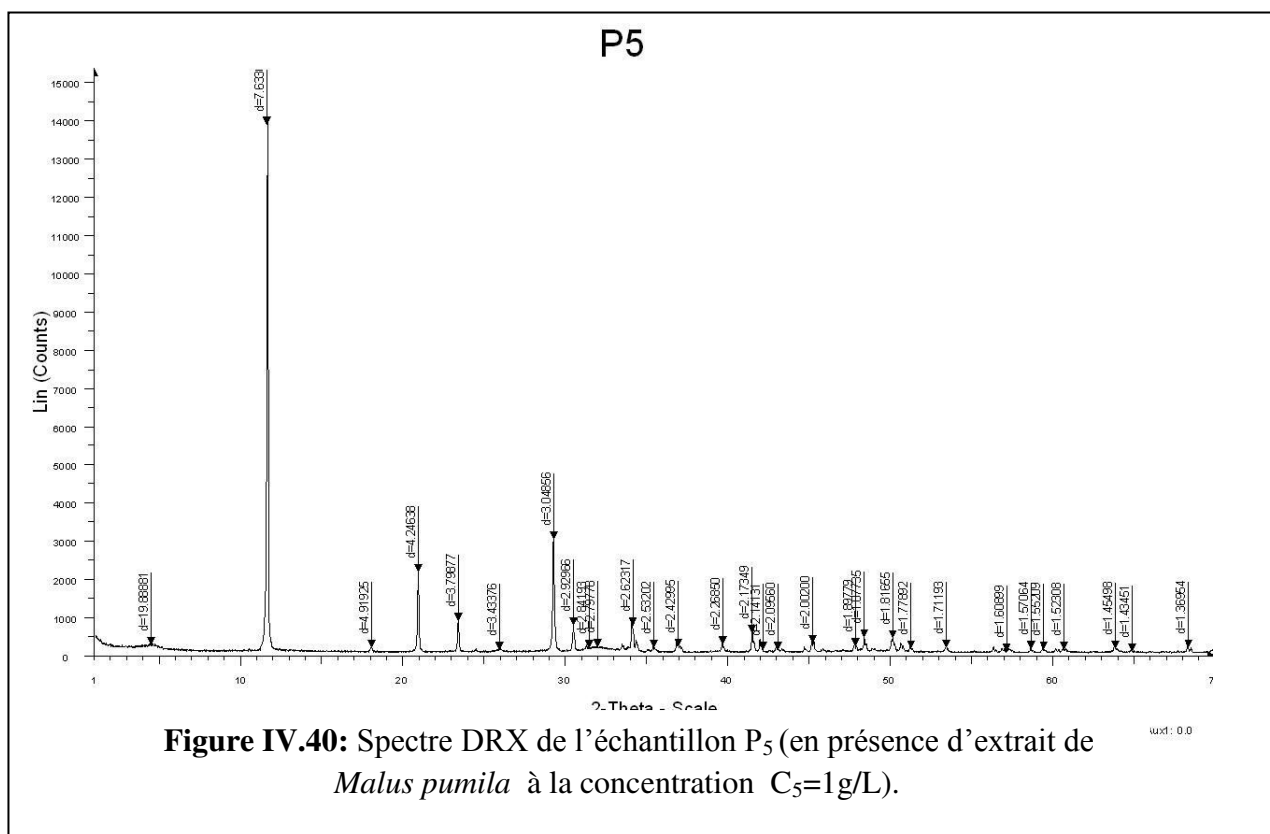
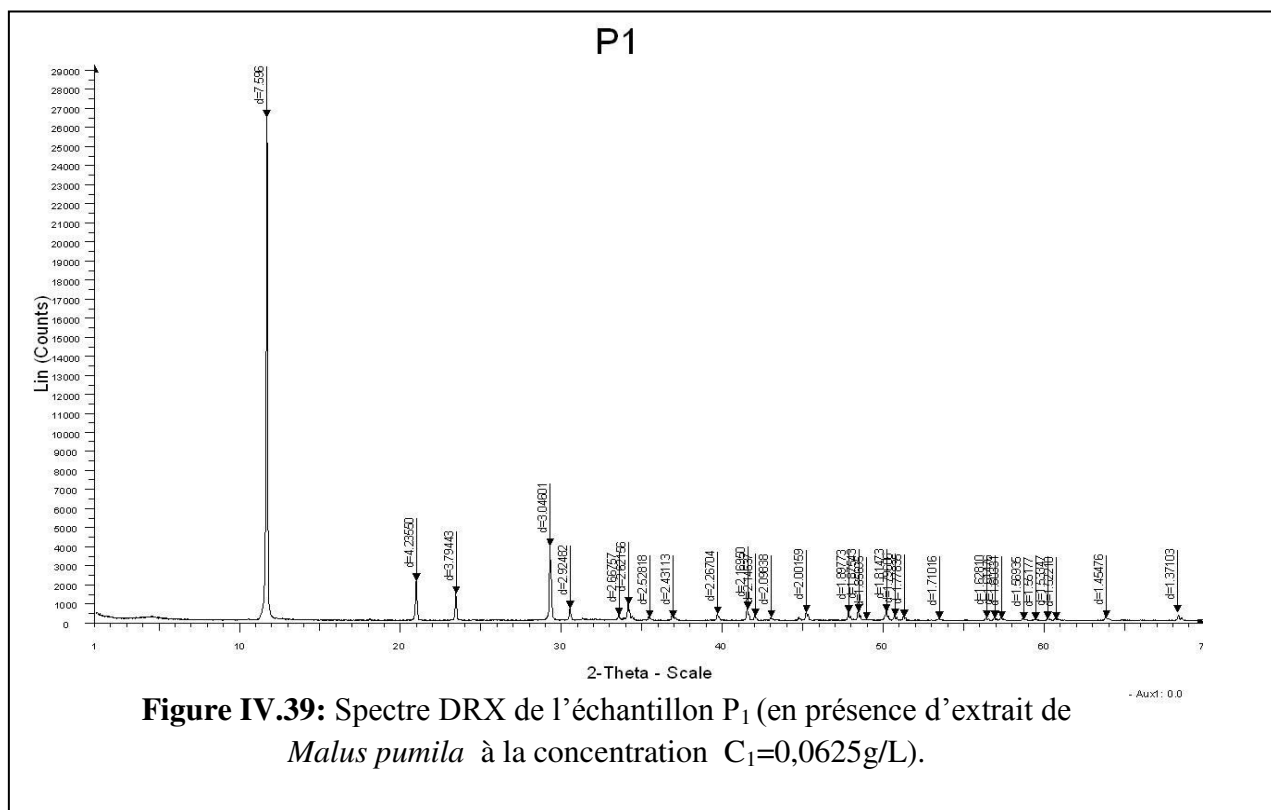
Figure IV.38: Spectre IR de l'échantillon P₅ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₅=1g/L).

II.3.2.3.4.b Analyse par Diffraction des rayons X (DRX)

La Diffraction des Rayons X est une technique d'analyse spectroscopique qui permet l'identification des composés chimiques.

Les échantillons recueillis à la fin d'étude de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux des pelures de pomme à la concentration C₁= 0.0625 et C₅= 1 g/L ont été analysés par deuxième technique qui est la diffraction des rayons X.

Les résultats spectraux obtenus ont été comparés avec les spectres DRX de références. Cette comparaison nous a permis de confirmer la phase cristalline obtenue à la fin des tests. Les spectres DRX des échantillons P₁ et P₅ (voir figure IV.39 et figure IV.40) confirment la précipitation de l'espèce phosphatique la brushite.



II.3.2.3.5 Etude de l'effet d'extrait des racines de *Rubia Tinctorum* (la garance) sur la cristallisation de la brushite

L'effet de l'infusion de la poudre de racines de *Rubia Tinctorum* à différentes concentrations (de 0,0625 à 1 g/L) sur la cristallisation de la brushite a été testé dans le modèle conductimétrique décrit précédemment. Pour des conditions initiales identiques, tous nos essais sont refaits six fois, ce qui nous permet de calculer le coefficient de variation CV qui doit être inférieur à 10%. Les taux d'inhibition ont été déterminés à partir des pentes conductimétriques en présence et en absence d'extrait aqueux de la plante testée (voir figure IV.41).

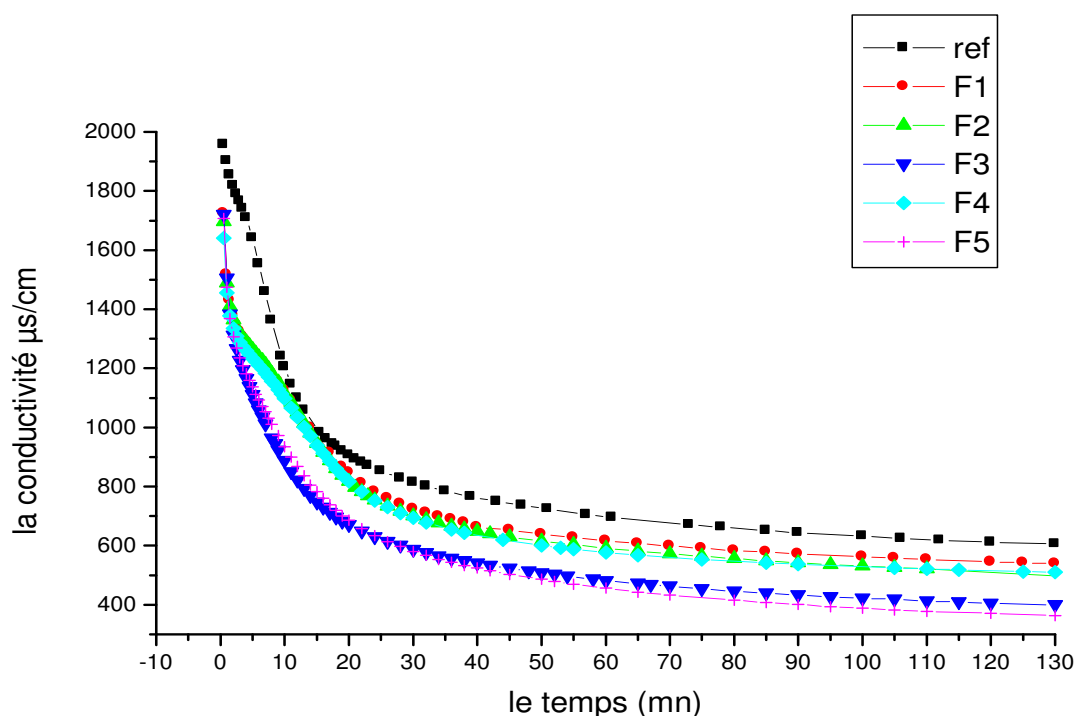


Figure IV.41: Courbes conductimétriques de la cristallisation de la brushite en absence et en présence d'extraits de *Rubia tinctorum*.

Les courbes conductimétriques obtenues par le suivi cinétique de la cristallisation de la brushite en présence de l'extrait des racines de garance aux différentes concentrations, ont toutes l'allure de la courbe de conductivité de référence.

L'addition des extraits aqueux de cette plante dans le processus de cristallisation de la brushite a modifié les paramètres conductimétriques de la courbe de référence. Les paramètres ainsi obtenus sont illustrés dans le tableau IV.7

Tableau IV.7 : Paramètres conductimétriques obtenus en présence des racines de garance.

Essai	ΔT	Pente	R^2	Erreur	CV %	Inhibition %
Sans inhibiteur	0,5-15,5	-74,62	0,994	<0,0001	6	
F ₁ (0,0625) g/L	1,5-28	-26,14	0,991	<0,0001	5,9	63%
F ₂ (0,125) g/L	1,5-28	-27,69	0,990	<0,0001	6,3	60,80%
F ₃ (0,25) g/L	2-13	-46,42	0,990	<0,0001	6,2	34,28%
F ₄ (0,5) g/L	1,5-28	-26,17	0,991	<0,0001	5,7	62,94%
F ₅ (1) g/L	2-19	-35,26	0,989	<0,0001	5,4	50,07%

II.3.2.3.5.a Analyse par spectroscopie IRTF

A la fin de chaque expérience, l'échantillon est filtré sous vide, sur membrane 0,45 μ m. le précipité recueilli après chaque cristallisation est analysé par microscopie infrarouge à transformé de fourrier afin de connaître l'espèce cristalline formée.

◆ II.3.2.3.5.a.1 Echantillon F₁ : En présence d'extrait de *Rubia tinctorum* à la concentration C₁=0,0625g/L.

L'analyse par IRTF du précipité obtenu à la fin de la cristallisation des phosphates calciques en présence d'extrait aqueux des racines de garance à la concentration C₁=0,0625 g/L nous a confirmé que la seule espèce cristalline formé était la brushite.

Le spectre IR de l'échantillon F₁ (voir figure IV.42), montre des bandes caractéristiques de la brushite (valence des molécules d'eau à 3533,95 et 3474,75 cm⁻¹, valence des phosphates à 1123,27 ; 1051,08 et 982,83 cm⁻¹), et la bande clé de la carapatite à 602,12 cm⁻¹.

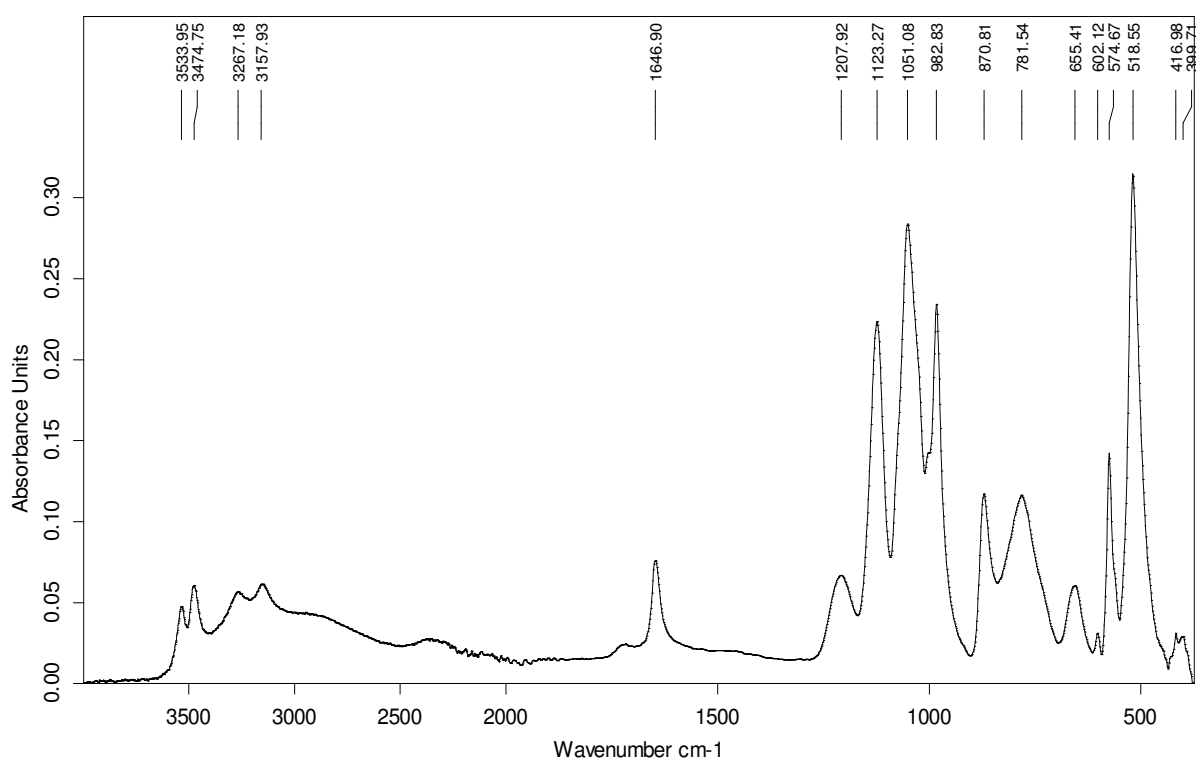
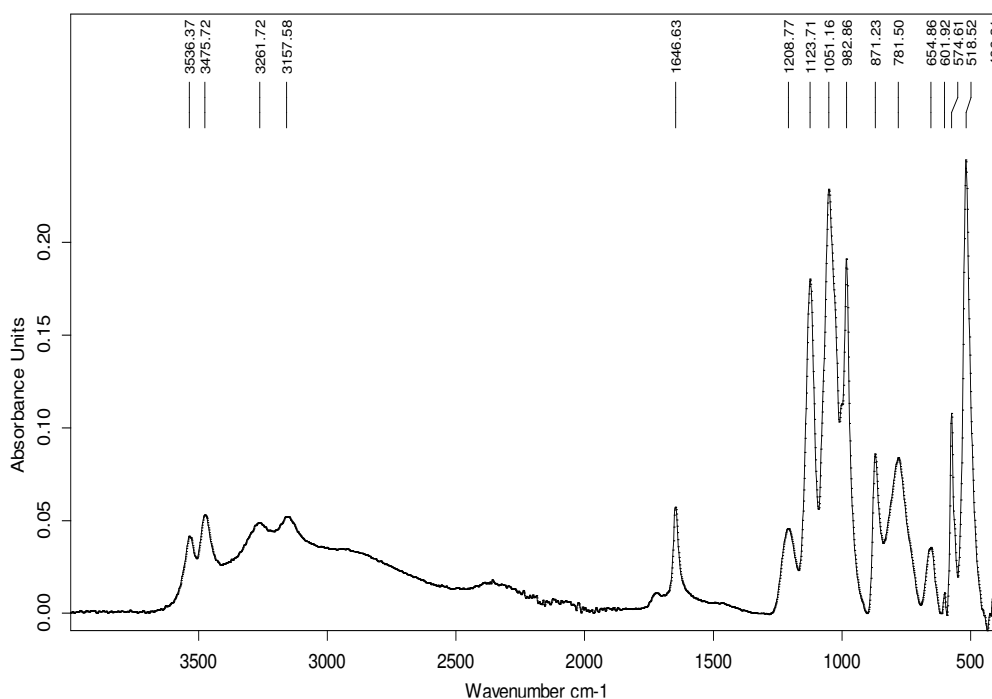


Figure IV.42: Spectre IR de l'échantillon F₁ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à la concentration C₁=0,0625g/L).

◆ II.3.2.3.5.a.2 Echantillon F₂: En présence d'extrait de *Rubia tinctorum* à la concentration C₂=0,125g/L.

Après le suivi cinétique de la cristallisation de la brushite en présence d'extrait des racines de garance à C₂= 0,125 g/L, le précipité blanc obtenu après filtration a été analysé par spectroscopie IRTF.

Le spectre IRTF obtenu pour l'échantillon F₂ (voir figure IV.43), montre que l'espèce phosphatique cristallisée est la brushite. Il comporte des fréquences caractéristiques de la brushite (valence des molécules d'eau à 3536,37 et 3475,72 cm⁻¹ et valence des phosphates à 1123,71 ; 1051,16 et 982,86 cm⁻¹). On observe aussi, une bande fine à 601,92 cm⁻¹ attribuée à la présence de la carbapatite.



Spectre IV.43: Spectre IR de l'échantillon F₂ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à la concentration C₂=0,125g/L).

◆ **II.3.2.3.5.a.3 Echantillon F₃: En présence d'extrait de *Rubia tinctorum* à la concentration C₃=0,25g/L.**

L'analyse spectrale du solide blanc F₃ recueilli à la fin de l'expérience (en présence d'extrait aqueux à la concentration C₃= 0,25 g/L) et l'identification avec le spectre de référence montrent que le composé phosphatique formé est principalement la brushite.

Le spectre obtenu par analyse spectroscopique (voir figure IV.44), donne l'ensemble des fréquences caractéristiques de l'espèce cristalline la brushite. On note la valence des molécules d'eau à 3533,11 et 3474,75 cm⁻¹ et la valence des phosphates à 1124,40 ; 1051,12 et 983,10 cm⁻¹. La bande fine à 601,68 cm⁻¹ est attribuée à l'existence des traces de la carapatite.

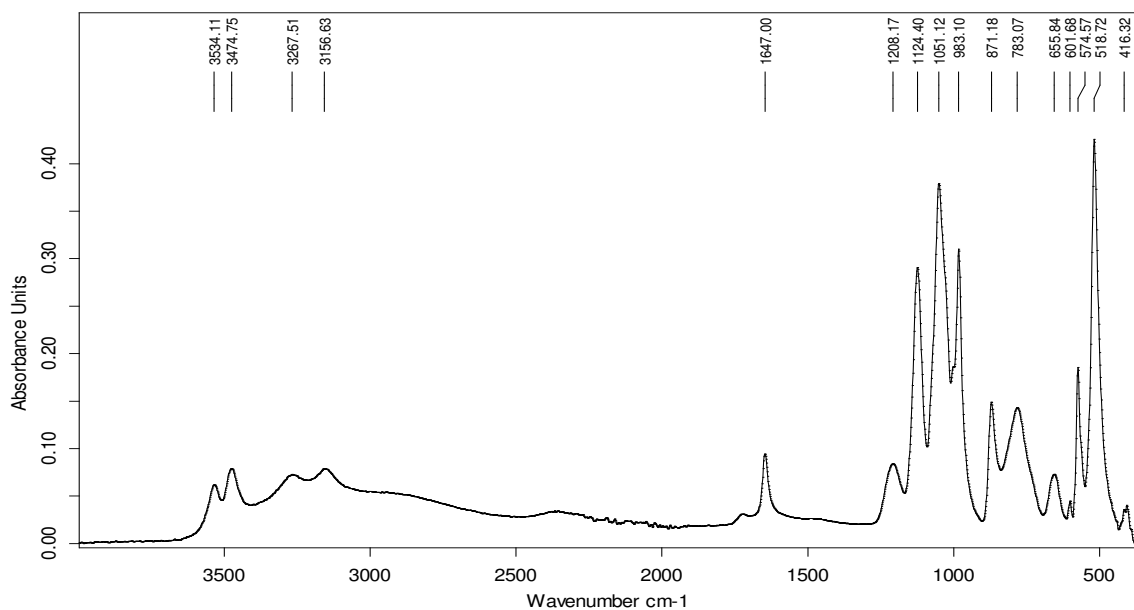


Figure IV.44: Spectre IR de l'échantillon F₃ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à la concentration C₃=0,25g/L).

◆ **II.3.2.3.5.a.4 Echantillon F₄ : En présence d'extrait de *Rubia tinctorum* à la concentration C₄=0,5g/L.**

Pour déterminer et confirmer les phases cristallines formées à la fin de l'expérience, nous avons analysé le précipité obtenu par la spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (voir figure IV.45).

Le spectre IRTF obtenu pour l'échantillon F₄, montre les bandes caractéristiques de la brushite. Il comporte des fréquences caractéristiques des phosphates (un triplet à 1124,17 ; 1051,66 et 982,86 cm⁻¹) et des molécules d'eau (bifide à 3532,12 et 3475,75 cm⁻¹). La carboxate se présente en forme de trace (bande fine à 601,73 cm⁻¹).

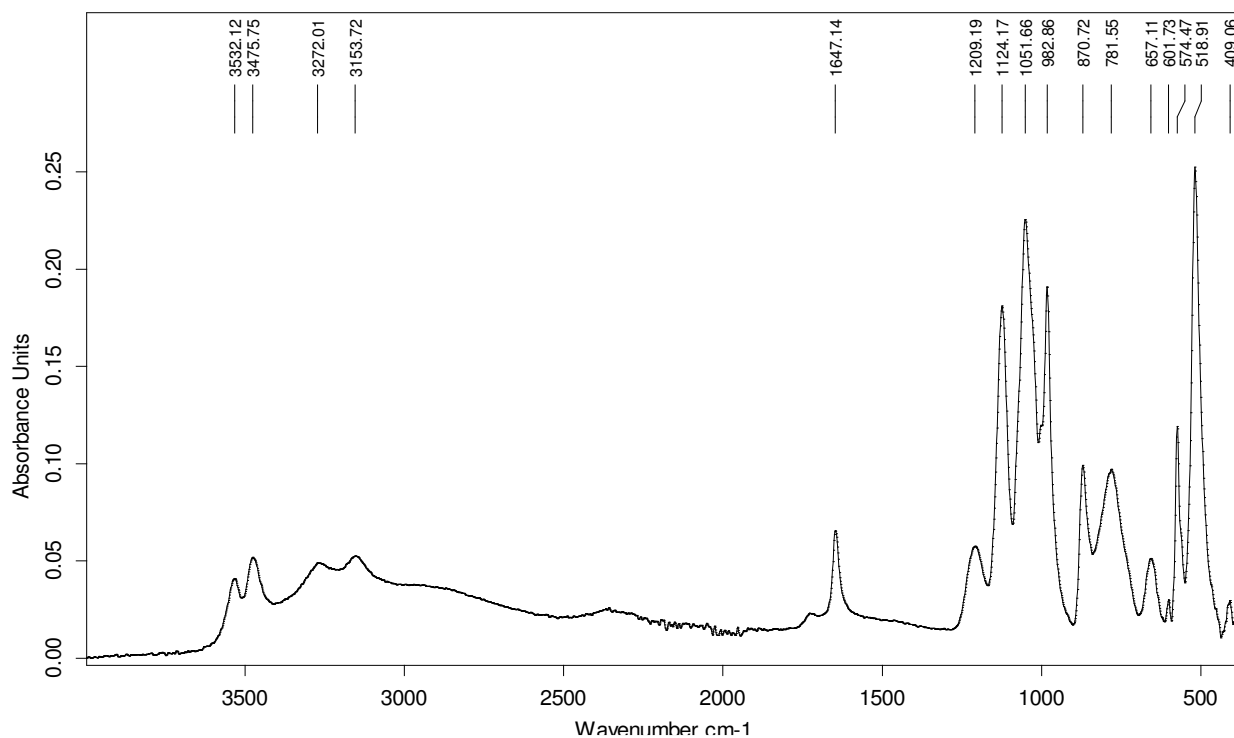


Figure IV.45: Spectre IR de l'échantillon F₄ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à la concentration C₄=0,5g/L).

◆ **II.3.2.3.5.a.5 Echantillon F₅ : En présence d'extrait de *Rubia tinctorum* à la concentration C₅=1g/L.**

L'analyse spectrale du précipité blanc F₅ recueilli à la fin de l'expérience (en présence d'extrait aqueux des racines de garance à la concentration C₅= 1 g/L) montre que les cristaux phosphatiques formés sont la brushite (voir figure IV.46).

Le spectre IR obtenu par analyse spectroscopique de l'échantillon F₅ donne l'ensemble des bandes caractéristiques qui confirment la précipitation de l'espèce cristalline la brushite. Les bandes caractéristiques observées sont : bifide des molécules d'eau à 3538,15 et 3473,92 cm⁻¹ et triplet des phosphates à 1126,06 ; 1052,48 et 983,46 cm⁻¹. L'épaule de la bande à 1030 et la bande fine à 602,11 cm⁻¹ sont attribués à la carapatite.

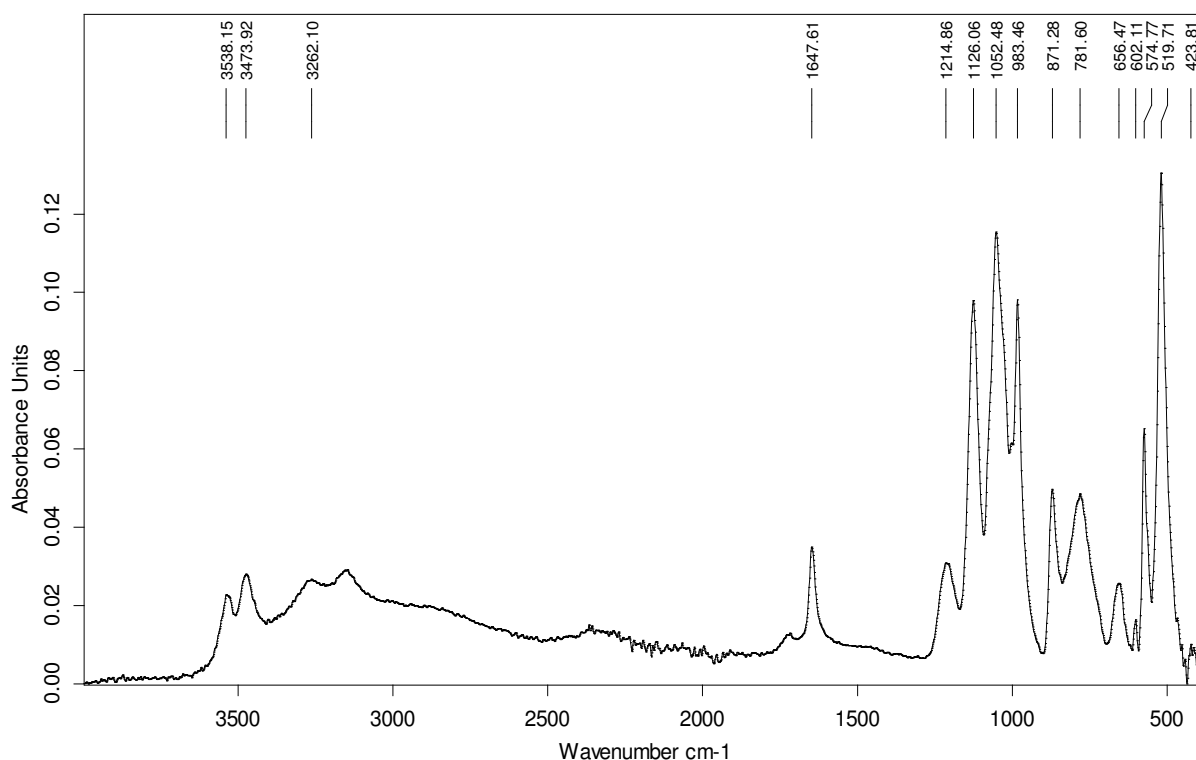
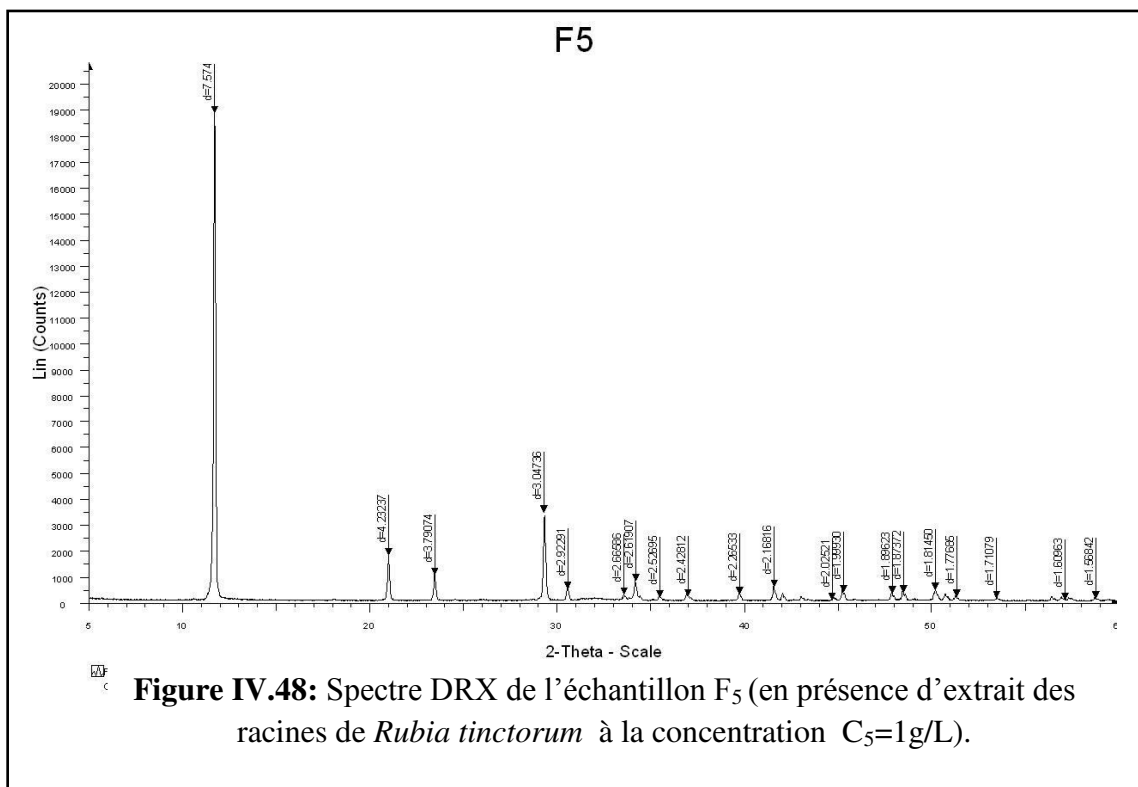
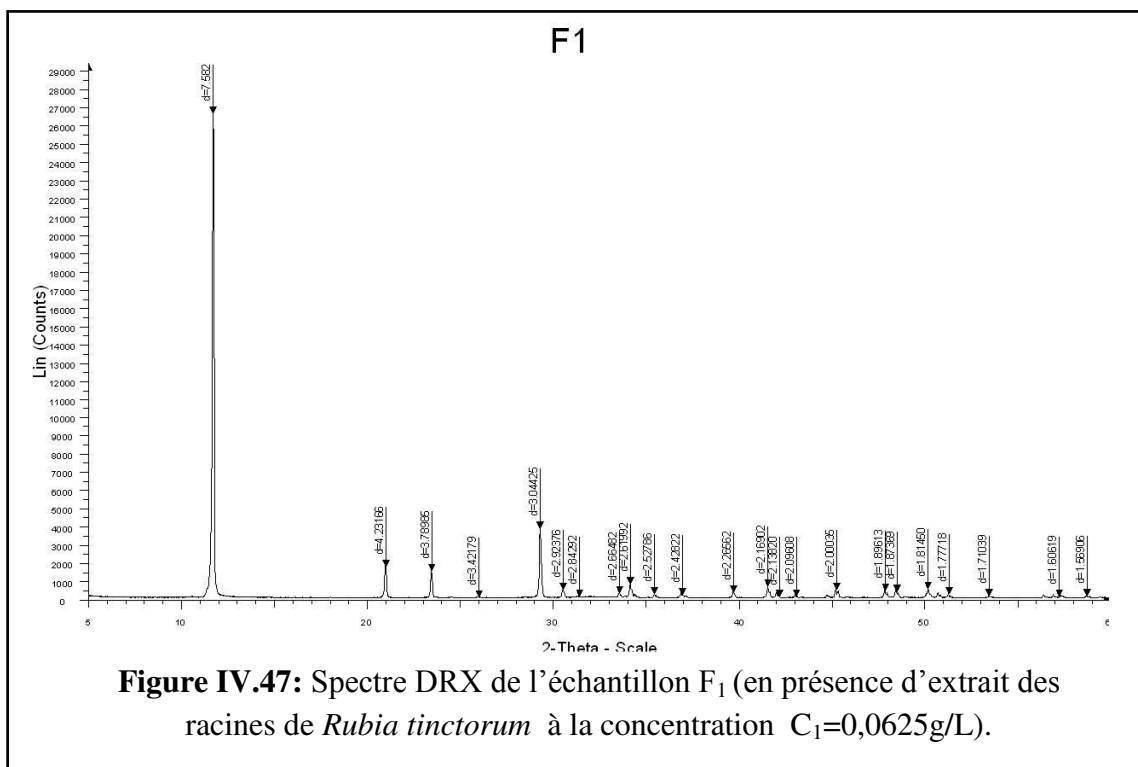


Figure IV.46: Spectre IR de l'échantillon F₅ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à la concentration C₅=1g/L).

II.3.2.3.5.b Analyse par Diffraction des rayons X (DRX)

Afin de confirmer la nature chimique de l'espèce phosphatiques qui se précipite à la fin des expériences, une deuxième méthode d'analyse spectroscopique était utilisée. Les échantillons obtenus après le suivi cinétiques de la cristallisation des phosphates calciques en présence d'extrait aqueux de la plante testée ont été analysés par la Diffraction des Rayons X (voir figure IV.47 et figure IV.48).

L'ensemble des raies obtenues par cette analyse spectroscopique pour ces deux échantillons sont comparés avec ceux de référence. Ces résultats confirment la formation des cristaux de brushite.



III Action des plantes sur la cristallisation de la brushite

Globalement tous les extraits aqueux des plantes testées ont inhibé la croissance des cristaux de brushite. En effet, tous les pourcentages d'inhibition obtenus par action des extraits aqueux des plantes sur la croissance cristalline de la brushite était de signe positif, ce qui témoigne d'un pouvoir inhibiteur, de degré différent d'une plante à une autre, vis-à-vis de l'étape de croissance de la brushite. La figure IV.49 illustre les pourcentages d'inhibition de chaque plante en fonction de leur concentration.

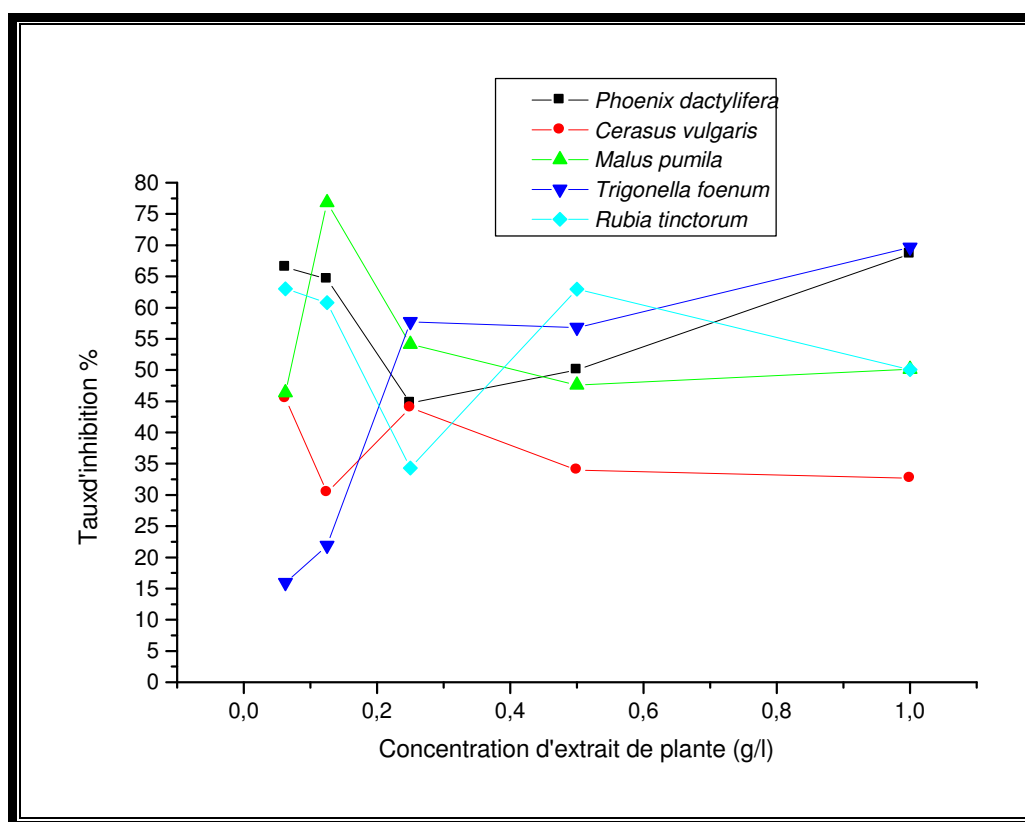


Figure IV.49: Pourcentage d'inhibition des extraits aqueux des plantes : *Phoenix dactylifera*, *Malus pumila*, *Trigonelle foenum*, *Rubia tinctorum*, *Cerasus vulgaris*, en fonction de leur concentration respective dans l'intervalle (1 à 0.0625 g/L) à 37 °C.

D'autre part, après ajout de chaque extrait aqueux de toutes plantes testées, le temps d'induction qui représente le temps initial de la croissance cristalline, a augmenté ce qui signifie un retard à la croissance cristalline. Il semblerait, puisque cet effet est le

même en présence de tous les extraits aqueux, que la dilution agit sur l'étape de nucléation et retarde ainsi l'étape de croissance des cristaux de phosphate calcique.

Pour les extraits aqueux de *Phoenix dactylifera*, nous avons observé un effet inhibiteur à toutes les concentrations testées, avec un effet important (soit 68,6%), à la plus forte concentration ($C_5=1\text{g/L}$)

Cependant cet effet diminue lorsque la concentration augmente jusqu'à 0.25g/L (44,7%) puis augmente à partir de 0.5g/L de la plante (50%).

Les extraits aqueux des graines de *Trigonella foenum* ont exercé un effet inhibiteur remarquable sur la cristallisation de la brushite. En effet, le pourcentage d'inhibition croît avec l'augmentation de la concentration en extrait de *Trigonella foenum*. La courbe met en évidence un très grand pouvoir inhibiteur (69,6%) du *Trigonella foenum* à la concentration de 1g/L vis-à-vis de la croissance cristalline.

Par ailleurs, en présence des *Malus pumila* à la concentration $C_2= 0,125\text{g/L}$, un effet inhibiteur maximal (76,8%) de la plante vis-à-vis de la croissance cristalline de la brushite est observé. Ce taux d'inhibition est le plus important observé de toute la série de plantes testées. Les autres concentrations de la plante présente aussi un effet inhibiteur de la croissance des cristaux mais à des taux moins importants que celui observé à la concentration C_2 .

A la concentration $C_3= 0,25\text{g/L}$, l'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* inhibe l'étape de la croissance mais à un taux le plus faible (34,3%), comparé à ceux observé en présence des autres extrait de la plante.

Il apparaît aussi que les extraits de *Cerasus vulgaris* inhibent à des degrés moindres la croissance cristalline du phosphate calcique et cela pour tout l'intervalle de concentration testées. Le plus grand effet inhibiteur (45,5%) de la plante a été observé à la plus faible concentration d'extrait $C_1= 0.0625\text{g/L}$.

Toutes ces observations concernant le % d'inhibition de la croissance cristalline montre l'importance de la nature de la plante et plus particulièrement le dosage de l'infusion de plante.



*Chapitre V:
Etude de l'effet des plantes
médicinales sur la cristallisation
de l'hydrogenophosphate de
calcium dihydraté « brushite »,
dans un modèle biologique*

Introduction

Une bonne connaissance des étapes du processus de cristallisation et une bonne définition des moyens thérapeutiques susceptibles de réduire la formation des cristaux dans l'urine et y induire un état de sous-saturation permettent d'assurer une prévention efficace afin d'éviter le risque de récurrence auquel praticien et patient sont confrontés (**Daudon et al, 2000 ; Daudon et al, 2008**). Une meilleure connaissance des étapes du processus de cristallisation et une bonne définition des moyens thérapeutiques susceptibles de réduire la formation des cristaux dans l'urine permettent une prévention efficace afin d'éviter le risque de récurrence auquel praticien et patient sont confrontés. Parmi les moyens thérapeutiques préventifs, le recours aux inhibiteurs de cristallisation (**Hennequin et al., 1993(a); Abdelmalek et al., 2001; Daudon, 2004; Amar et al., 2006**).

Cependant, il est important de connaître les spécificités propres à la cristallisation de chaque espèce lithogène afin de réduire la sursaturation urinaire et de bloquer efficacement le processus de la lithogénèse par la supplémentation en inhibiteurs de la cristallisation. Comme espèces lithogènes, les phosphates calciques occupent une place particulière en raison de leur fréquence et de la difficulté de les identifier avec précision par simple examen microscopique. Ils peuvent cristalliser sous des formes très variées avec différents degrés d'acidité. Pour ce qui est de la brushite ou phosphate acide de calcium dihydraté ($\text{CaHPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$), rare chez les sujets non lithiasiques, est une espèce cristalline particulièrement lithogène en raison de son aptitude à former dans des urines hypercalciuriques des cristaux en aiguilles et baguettes de grandes dimensions, souvent supérieurs à 50 μm et qui s'agrègent facilement, entraînant un risque lithogène accru (**Rouzière et al, 2009**). Certes la fréquence de la brushite dans les calculs est faible <2% des lithiases, mais elle génère des calculs durs qui se fragmentent difficilement à la lithotripsie et sévères à cause de leur agressivité et leur récurrence. Des travaux anciens ont montré que la brushite est la phase solide formée par précipitation spontanée de l'urine acide sursaturée en calcium et phosphates, constituant ainsi le noyau des calculs calciques (**Pak et al, 1971**).

La médecine douce, qui consiste à se soigner à l'aide de plantes médicinales et d'espèces naturelles, rencontre depuis quelques années un succès croissant (OMS, 2003). En effet, les plantes médicinales ont fait l'objet, ces dernières années, de nombreuses études scientifiques (Yadav et al, 2011) et sont de plus en plus intégrées aux traitements médicamenteux particulièrement dans les sociétés industrialisées.

En outre, le recours aux plantes médicinales est encore mal documenté et repose pour l'essentiel sur les recommandations des herboristes ou sur les vertus thérapeutiques et les connaissances empiriques issues de l'usage traditionnel au sein de la population ou encore sur les croyances propres à la culture ethnique inhérente à chaque région du pays (Amar et al, 2010 ; Djaroud et al, 2012).

Ainsi, l'absence de travaux approfondis et d'études scientifiques démontrant l'effet réel de certaines plantes médicinales sur le risque lithogène, nous a incités à étudier et valider l'action de certaines plantes sur la cristallisation phosphocalcique, notamment la brushite, dans un modèle biologique (urine totale humaine).

V.1 Méthodologie :

V.1.1- Précipitation de la brushite

Dans la présente étude, la formation de la brushite est induite dans un milieu urinaire, en absence et en présence d'extraits de plantes médicinales, selon les protocoles antérieurs, utilisés dans notre laboratoire (Amar et al, 2010; Djaroud et al, 2012).

La méthodologie utilisée pour la précipitation de brushite (phosphate calcique dihydraté) de formule chimique $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est celle de la neutralisation de la deuxième acidité de l'acide orthophosphorique H_3PO_4 dans la chaux $\text{Ca}(\text{OH})_2$. La composition des deux solutions permet de maintenir un rapport atomique $\text{Ca}/\text{P}=1$ dans le milieu de précipitation (pour cette partie : le milieu urinaire), ce qui correspond au rapport de formation de la brushite (St Pierre PDS, 1955). Habituellement, la brushite cristallise à pH moyen de 6,2 dans les urines fraîches.

Les urines des 24h d'un sujet masculin sain, sans antécédents lithiasiques (modèle biologique), ont été collectées et conservées dans une bouteille en plastique sans ajout d'agent antibactérien. Le pH de l'urine était de 6,5. Une aliquote de 8 ml d'urine et de

200 µl d'une solution acide d' H_3PO_4 à 0.1M et 200µl d'infusion (extrait aqueux) à différentes concentrations (C1=0.0625 g/L, C2=0.125g/L, C3=0.25g/L, C4=0.5g/L, C5=1 g/L) ont été placés dans plusieurs tubes. En parallèle, un tube sans extrait de la plante est laissé comme référence (échantillon 1, de référence).

Tous les tubes (au nombre de sept) sont incubés à 37°C. La cristallisation de la brushite est induite par l'addition de 200 µl d'une solution de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ à 0.1M, préalablement conservée à 37°C. La mesure du pH du milieu de cristallisation est suivie, à l'aide d'un pH-mètre inoLab pH. Puis, tous les tubes sont incubés à nouveau à 37°C, pendant 6 heures. A la fin de la cristallisation des phosphates, les échantillons ont été filtrés sous vide sur membranes 0.45 µm, en mesurant préalablement le pH final des solutions. Les filtres ont été observés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et soumis aussi à l'analyse par infra rouge (IRTF).

V.1.2- Préparation des extraits aqueux des plantes médicinales

Dans cette étude, le choix des plantes médicinales s'est basé sur les recommandations des herboristes ou sur les vertus thérapeutiques et les connaissances empiriques issues de l'usage traditionnel au sein de la population ou encore sur les croyances propres à notre culture.

Les plantes utilisées dans ce modèle sont : *Phoenix dactylifera L* (poudre de noyaux de dattes), *Trigonella foenum* (fenugrec), *Malus pumila* (pelures de pomme), *Cerasus vulgaris* (queues de cerise), *Rubia tinctorum L* (garance) et *Hordeum Vulgare* (orge).

Les extraits aqueux des plantes ont été préparés de la manière qui a été décrite dans le modèle conductimétrique (chapitre V). L'orge qui n'a pas été utilisé dans le modèle conductimétrique, a été préparé en infusion à des concentrations de (0.0625 ; 0.125 ; 0.25 ; 0.5 et 1 g/L). Le choix de tester des infusions a été opté afin de se rapprocher au mieux de la procédure utilisée par le malade lithiasique (Amar et al, 2010; Djaroud et al, 2012).

V.1.3 Caractérisation des cristaux :

V.1.3.a Analyse au microscope électronique à balayage (MEB)

Les microscopes électroniques à balayage utilisés, pour cette partie de l'étude, sont :

Le premier du type Philips XL 30 ESEM (Eindhoven, Neederlands) équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie des RX (EDAX) (Mahwab, NJ, USA), disponible à l'Université de Valencia (Espagne) et Les échantillons passent par une métallisation préalable à l'alliage Au-Pd.

Et le second microscope utilisé est du type TM1000 équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie des RX (DRX), disponible à l'université de Tlemcen.

L'observation par microscopie électronique à balayage (MEB) des filtres obtenus après la cristallisation, nous permet d'avoir la morphologie, la taille, l'agrégation et l'abondance des cristaux de brushite et d'autres phosphates calciques formés dans l'urine totale, en absence et en présence des différents extraits de plantes testées.

V.1.3.b Analyse par infra rouge à transformée de Fourier(IRTf)

Les phosphates calciques ont une similitude de structure cristalline et de morphologie qui ne permettent pas de les distinguer les unes des autres par un simple examen microscopique. Cependant, lorsque le pH dépasse 6,5, la précipitation des phosphates calciques sous forme de carapatite et PACC est fréquente et ces dernières sont des espèces ayant globalement l'aspect de granulations, comme celles observées dans ces échantillons. Pour pouvoir identifier et distinguer le type d'apatite observée, il serait nécessaire de recourir à des techniques d'identification moléculaire et cristalline comme la diffraction X ou la spectroscopie infrarouge.

Les échantillons recueillis à la fin de la cristallisation, ont été soumis à l'analyse par spectroscopie infra rouge afin de pouvoir caractériser et distinguer les différents phosphates calciques formés. Les spectres IR sont obtenus en utilisant un spectromètre «Bruker Alpha FT-IR Spectrometer», équipé de ALPHA platine d'ATR d'une simple réflexion et du module de diamant d'ATR disponible à l'université d'Es Sénia.

V.2 Résultats

V.2.1 Etude de l'effet des extraits aqueux de *Pheonix dactylifera L* sur la cristallisation de la brushite

V.2.1.1 Cristallisation de la brushite, en absence d'extrait aqueux de *Pheonix dactylifera L*

La cristallisation de la brushite a été induite en milieu urinaire, selon le procédé décrit dans la méthodologie. Les valeurs du pH mesuré dans le milieu réactionnel, sont résumées dans le tableau V.1. La mesure du pH du milieu peut être un élément d'orientation dans la forme de phosphates formés.

Tableau V.1 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence).

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation		
		Initial	Après 2h	Final
pH (à 37°C)	6,51	6,67	6,70	6,62

V.2.1.1.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

Le précipité obtenu par filtration de la solution (de référence : échantillon1) a été observée par MEB. La micrographie obtenue de l'ensemble du filtre est illustrée dans la figure V.1. Cette observation a révélé une forte cristallisation de phosphate acide de calcium dihydraté (brushite) en aiguilles épaisses ou en baguettes et de granulations sphériques blanchâtres isolées et parfois en amas d'apatite.

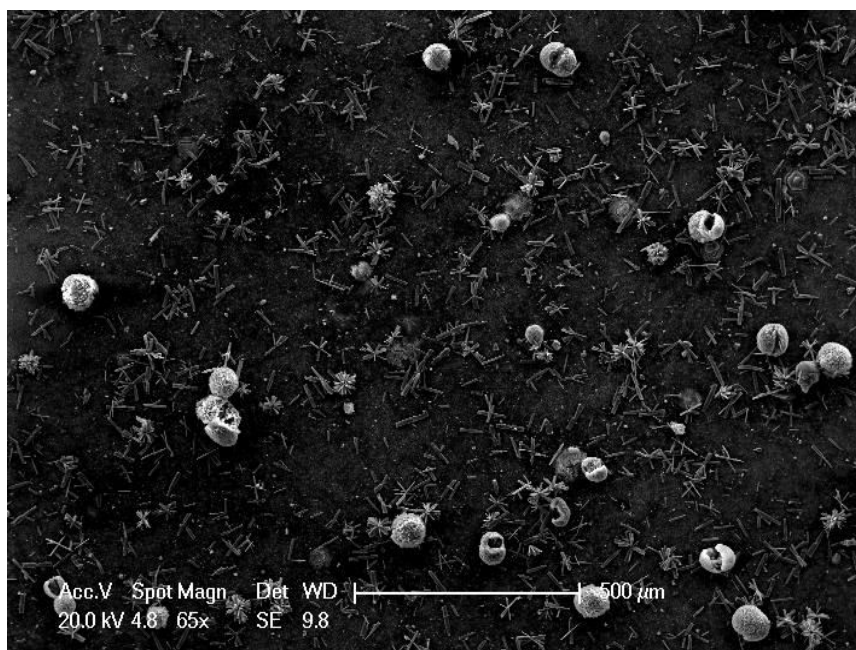


Figure V.1 Micrographie MEB (65x) de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) (vue globale)

L'agrandissement de la micrographie de l'échantillon de référence, révèle la présence de macles de brushite dont la taille maximale est 76 μm (voir figure V.2(a)), d'innombrables cristaux de brushite agrégés radialement d'aspect d'oursin ou en gerbe de taille moyenne de 60 μm (voir figure V.2(b)) ou en forme de baguette de taille maximale de 81,7 μm (voir figure V.2(c)), de nombreux et volumineux agrégats formés de cristaux agrégés radialement (aspect en oursin ou en gerbe) et des macles de brushite (voir figure V.2(d)). D'autre part, cette observation montre aussi la présence de granulations sphériques blanchâtres isolés et parfois en amas d'apatite de taille moyenne de 70 μm (voir figure V.2(e)). Ces granulations sphériques d'apatite forment des agrégats hétérogènes avec les cristaux de brushite (voir figure V.2(f)).

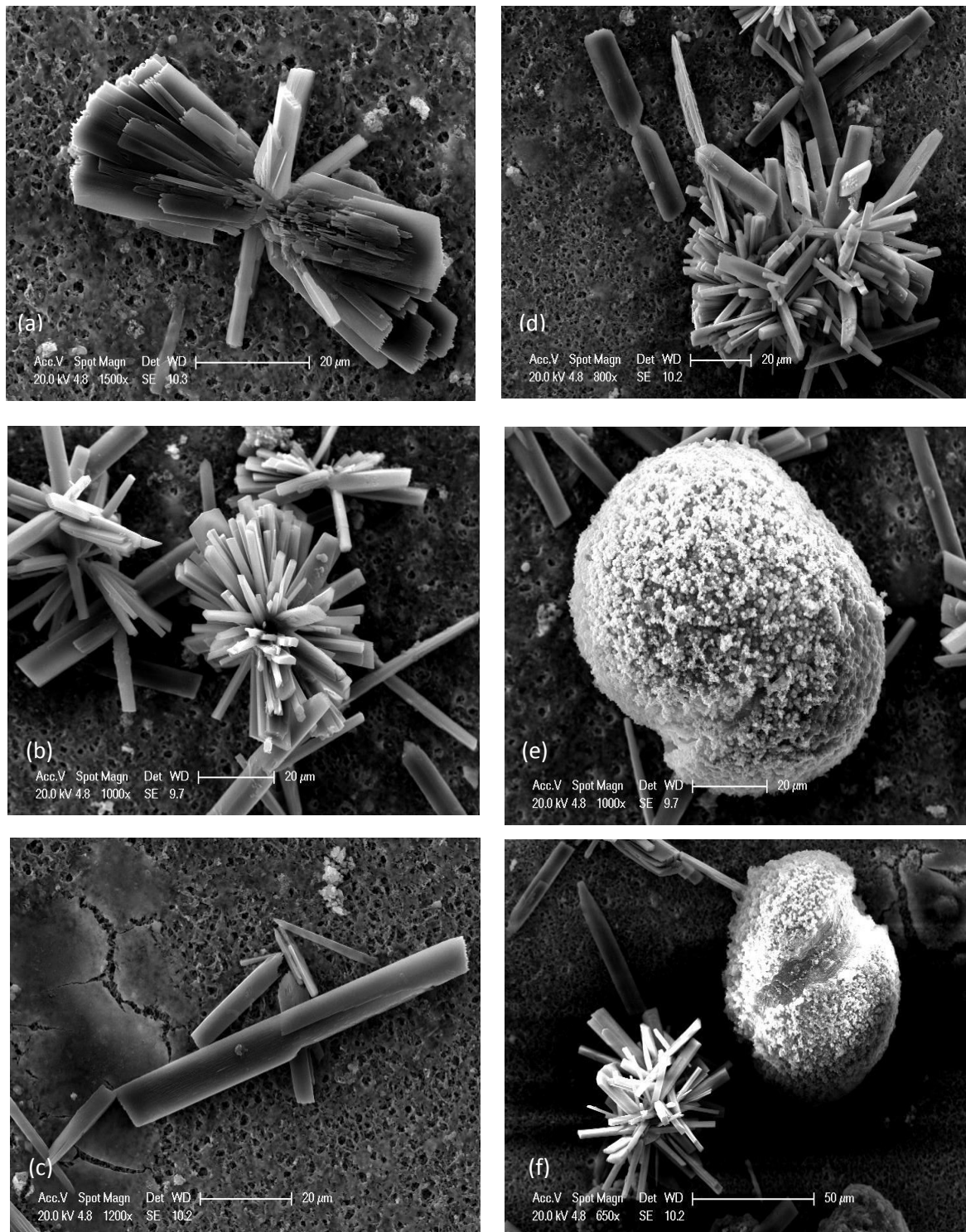


Figure V.2 : Micrographie MEB de l'échantillon de référence (sans inhibiteur) à différents agrandissements. (a) : macle de brushite; (b) : cristaux de brushite agrégés radialement d'aspect en oursin ; (c) : cristaux de brushite en forme de baguette ; (d) : agrégats formés de macles et cristaux d'aspect en gerbe de brushite ; (e) : granulation sphérique d'apatite; (f) : agrégats de cristaux de brushite (en forme de gerbe ou baguette) et de granulation d'apatite

D'autre part, la micrographie MEB (2500x) de la surface d'une des granulations sphériques observées et illustrées dans la figure V.2(c), montre un amas d'innombrables petites sphérules faisant apparaître des formes en aiguilles (voir figure V.3), suggérant une conversion de la brushite en apatite. En effet, la brushite est considérée comme thermodynamiquement instable, elle se convertit en apatite, ce qui explique la rareté de la brushite dans les calculs (Rouzière et al, 2009 ; Francis, 1981).

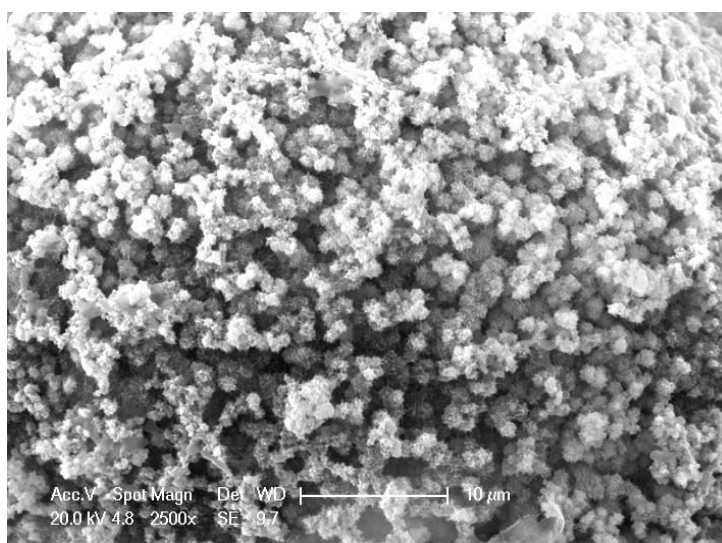


Figure V.3 Micrographie MEB (2500x) de la surface d'une granulation sphérique d'apatite

V.2.1.2 Cristallisation de la brushite dans l'urine, en présence des extraits aqueux de noyaux de *Phoenix dactylifera L*

Le dattier, synonyme de vie au désert (Achoura et Belhamra, 2010) et dont les usages sont très nombreux chez les populations oasiennes, est une plante médicinale sur le plan curatif et préventif. Les populations oasiennes du sud algérien ont su mettre au point des préparations médicinales à base de dattes et de leur sous produits. L'utilisation des produits et des sous-produits du palmier dattier *Phoenix dactylifera L* dans la pharmacopée traditionnelle est une pratique vieille comme le monde.

En effet, dès l'antiquité, les populations sahariennes élaboraient de nombreux produits avec les dattes qu'elles utilisaient pour leur alimentation et leur pharmacopée (Munier, 1973).

Des noyaux de dattes fraîches *Phoenix dactylifera L* (variété Deglat Noir) ont été séparés puis lavés à l'eau distillée, séchés pendant deux jours à l'air libre et enfin réduits en poudre. Une fois tamisées finement, une suspension mère à 40 g/L de poudre dans l'eau distillée bouillante a été préparée, puis laissée à infuser pendant 10 minutes. L'infusion est filtrée sous vide, sur membrane 0.45 μm . Des solutions aqueuses filles à différentes concentrations (0.0625 ; 0.125 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 et 40 g/L) ont été préparées. Le pH du milieu de précipitation des phosphates en présence des extraits aqueux de noyaux de dattes est presque constant durant la réaction. Le pH de l'urine utilisée comme modèle de précipitation est de 6.51 (à 37°C).

■ **V.2.1.2.1 Echantillon UD1 : en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration ($C_1= 0.0625\text{g/L}$)**

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel de cristallisation de la brushite pour l'échantillon UD₁.

Tableau V.2 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD₁ (en présence de l'extrait de *Phoenix dactylifera L*, à 0,0625g/L

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation		
		Initial	Après 2h	Final
pH (à 37°C)	6,51	6,70	6,66	6,64

V.2.1.2.1.a- Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence d'extrait aqueux des graines à la concentration $C_1=0,0625\text{ g/L}$, les cristaux observés sont de la même espèce que ceux observés dans l'échantillon de référence. Cependant l'abondance des cristaux de phosphates calciques est moins importante dans cet échantillon comparé au précédent de référence (voir figure V.4).

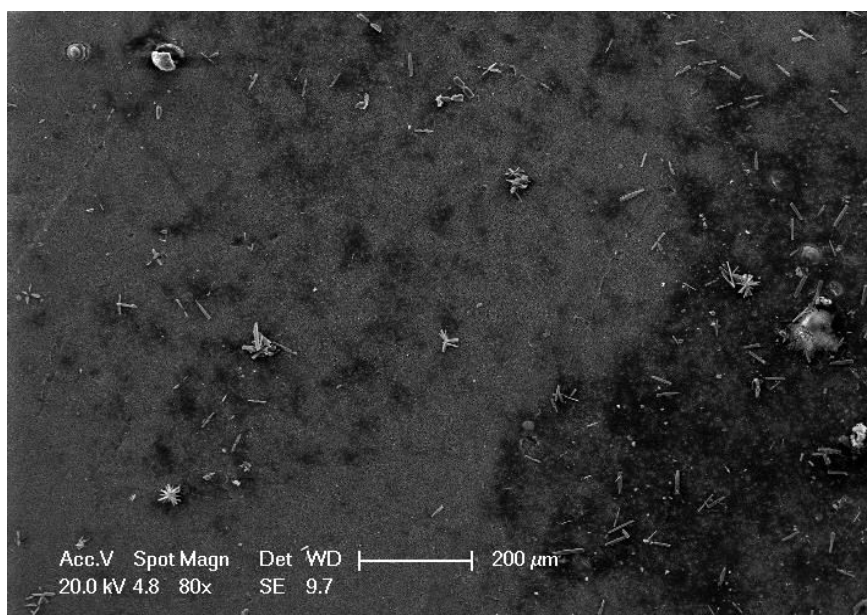


Figure V.4 Micrographie MEB (80x) de l'échantillon UD₁ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à 0.0625g/L) (vue globale)

Cet échantillon présente des cristaux asymétriques de brushite agrégés radialement en gerbe (de taille moyenne de 60 µm) en nucléation hétérogène avec des granulations éparses d'apatite (voir figure V.5(a)), des agrégats de cristaux de brushite en forme de baguette et en forme de gerbe (voir figure V.5(b)) ainsi que des agrégats de macles de brushite (voir figure V.5(c)). Par ailleurs, la taille des cristaux de brushite a diminué comparée à celle de l'échantillon de référence. En effet, en présence de l'infusion à 0,0625 g/L, la taille maximale des cristaux asymétriques de brushite a été réduite (de ~82 à 45 µm).

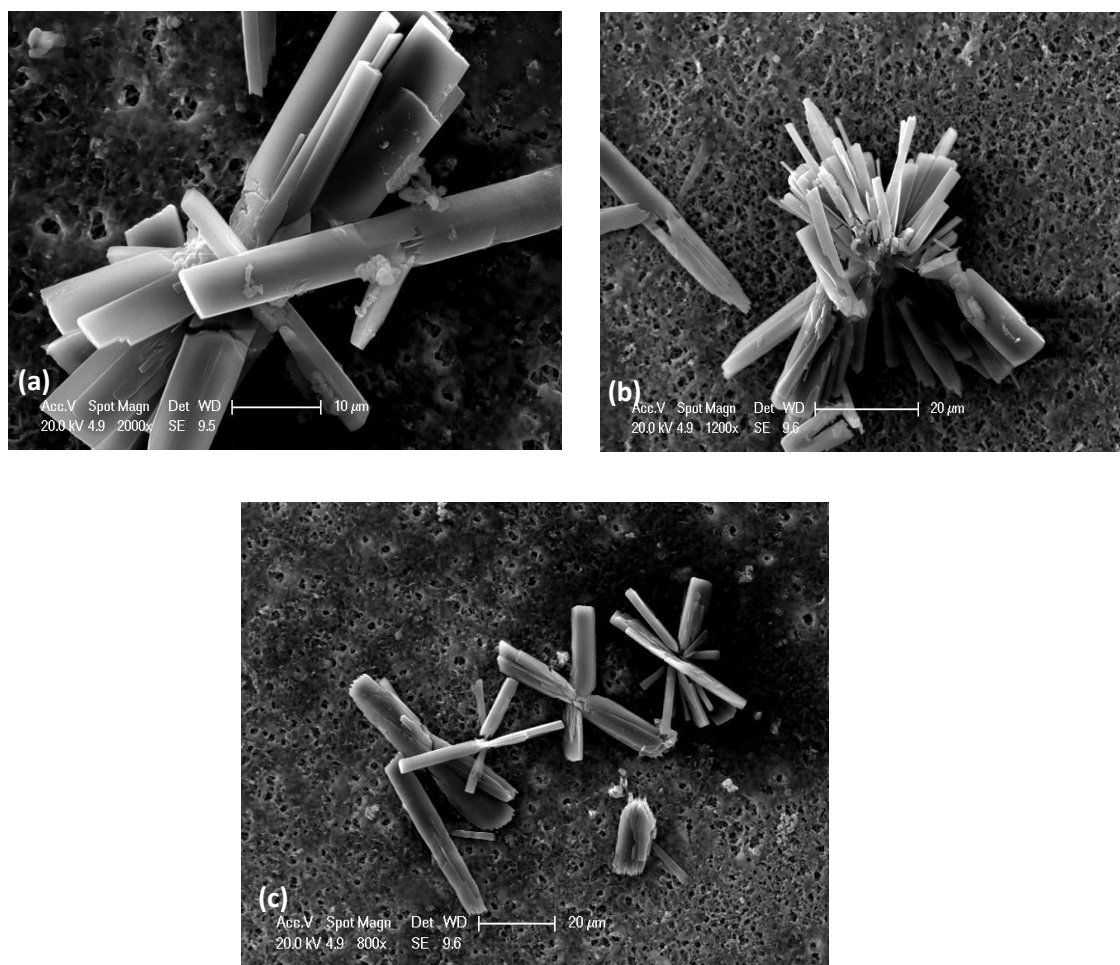


Figure. V.5 Micrographie MEB de l'échantillon UD₁ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 0,0625 g/L), à différents agrandissements. (a) : cristallisation hétérogène de brushite agrégée en forme de gerbe et d'apatite ; (b): agrégats de cristaux de brushite en forme de gerbe et en forme de baguette ; (c): agrégats de cristaux maclés de brushite.

■ **V2.1.2.2 Echantillon UD₂ : en présence d'extrait de *Phoenix dactylifera* à la concentration C₂= 0,125g/L**

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UD₂ testé à 37⁰C (le pH est resté constant durant la cristallisation).

Tableau V.3 : Valeurs du pH (à 37⁰C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD₂ (en présence de l'extrait de *Phoenix dactylifera L*, à 0,125g/L

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation		
		Initial	Après 2h	Final
pH (à 37 ⁰ C)	6,51	6,66	6,66	6,66

V.2.1.2.2.a Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence d'extrait aqueux de noyaux de dattes à 0,125 g/L, une forte cristallisation de phosphates calciques sous forme de cristaux de brushite et de granulations sphériques d'apatite est observée, comme le montre l'image prise par MEB (80x), illustrée dans la figure V.6.

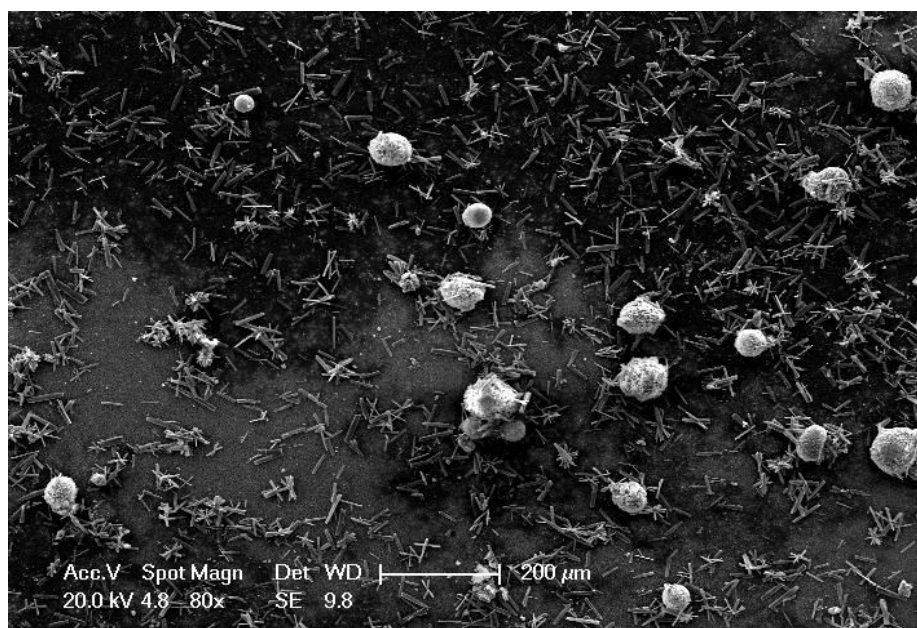


Figure V.6 Micrographie MEB (80x) de l'échantillon UD₂ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 0,125 g/L) (vue globale)

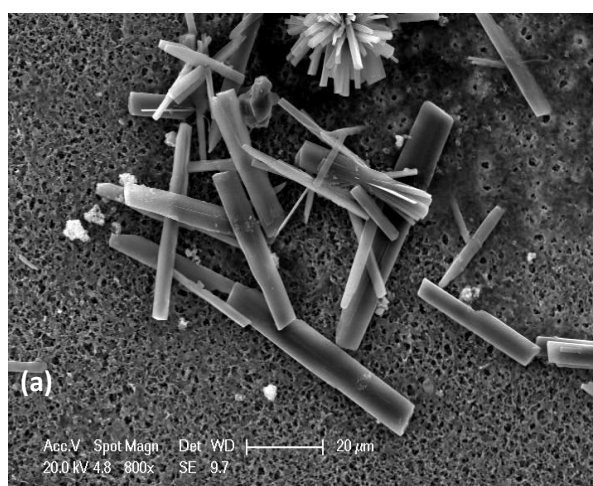


Figure V.7 Micrographie MEB de l'échantillon UD₂ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 0,125 g/L), à différents agrandissements. (a) : cristallisation hétérogène de brushite agrégée d'aspect en oursin ou en macles et de granulations éparses d'apatite ; (b) : très forte abondance d'agrégats de cristaux de brushite en forme de baguette ou agrégés en forme de gerbe et d'apatite sous forme de granulations sphériques blanchâtres

Les micrographies illustrées dans la figure V.7 révèlent d'une part, un important agrégat de cristaux de brushite d'aspect en oursin ou en macles et de granulations éparses d'apatite (voir figure V.7(a)) et d'autre part, une très forte abondance d'agrégats de cristaux de brushite en forme de baguette ou agrégés en forme de gerbe associés à des granulations sphériques blanchâtres d'apatite (voir figure V.7(b)).

■ V.2.1.2.3 Echantillon UD₃: en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* L à la concentration (C₃= 0,25g/L)

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UD₃ testé à 37°C.

Tableau V.4 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD₃ (en présence de l'extrait de *Phoenix dactylifera* L, à 0,25g/L

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation		
		Initial	Après 2h	Final
pH (à 37°C)	6,51	6,65	6,63	6,67

V.2.1.2.3.a Analyse par microscopie électronique à balayage

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB de l'échantillon obtenu en présence de l'extrait à 0,25 g/L, montre une forte cristallisation de brushite accompagnée de quelques granulations blanchâtres d'apatite (voir figure V.8).

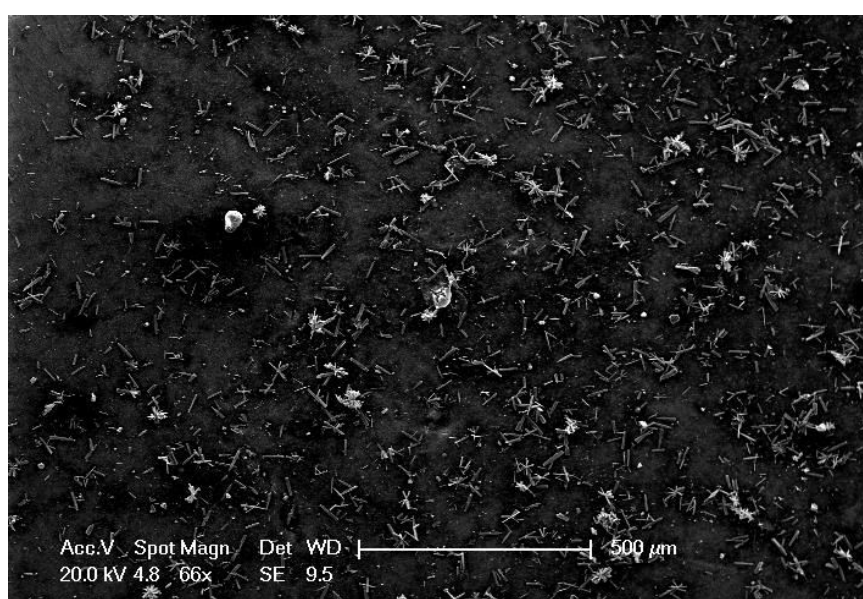


Figure. V.8 Micrographie MEB (66x) de l'échantillon UD₃ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 0,25 g/L) (vue globale)

L'agrandissement à 1000x de l'image MEB, révèle la présence d'agrégats formés de cristaux de brushite en macles de taille allant jusqu'à 60 μm et en forme de baguette de taille maximale 57 μm (voir figure V.9(a)). L'agrandissement à 150x, illustré dans la figure V.9b montre la présence de nombreux agrégats d'apatite en forme de granulations sphériques blanchâtres et de brushite en forme d'aiguilles épaisses asymétriques. D'autres volumineux agrégats formés de macles de brushite et de granulations éparses d'apatite sont observées (voir figure V.9(c)).

Une autre observation importante est la présence de granulations d'apatite en cristallisation hétérogène sur des cristaux de brushite agrégés radialement, d'aspect en oursin (voir figure V.9(d)) de 49,7 μm de taille et qui peut correspondre à une transformation de phase brushite - apatite.

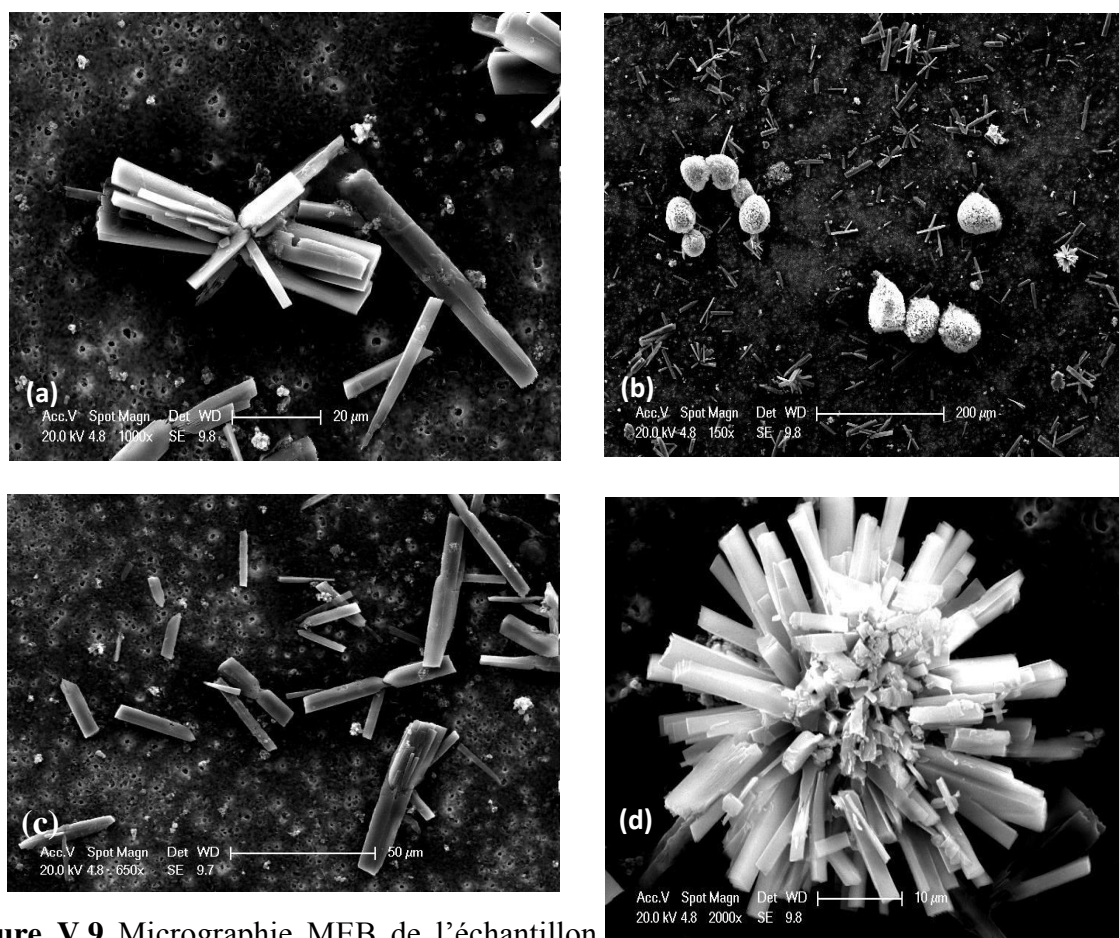


Figure V.9 Micrographie MEB de l'échantillon de *Phoenix dactylifera L* à 0,25 g/L), prises à différents agrandissements. (a) : présence d'agrégats formés de cristaux de brushite en macles et en forme de baguette ; (b) : granulations sphériques blanchâtres en amas d'apatite et des cristaux de brushite en forme d'aiguilles épaisses et asymétriques ; (c) : macles de brushite en cristallisation hétérogène avec des granulations d'apatite ; (d) : cristallisation hétérogène d'apatite sur brushite d'aspect en oursin

■ V.2.1.2.4 Echantillon UD₄ : en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* L à la concentration (C₄= 0,5g/L)

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UD₄ testé à 37°C (le pH reste presque constant durant la cristallisation).

Tableau V.5 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD₄ (en présence de l'extrait de *Phoenix dactylifera* L, à 0,5g/L

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation		
		Initial	Après 2h	Final
pH (à 37°C)	6,51	6,64	6,62	6,65

V.2.1.2.4.a Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence de l'extrait de noyaux de dattes à 0,5 g/L, l'échantillon dont l'image MEB est illustré dans la figure V.10, révèle une cristallisation de brushite et d'apatite moins importante que dans tous les échantillons précédents.

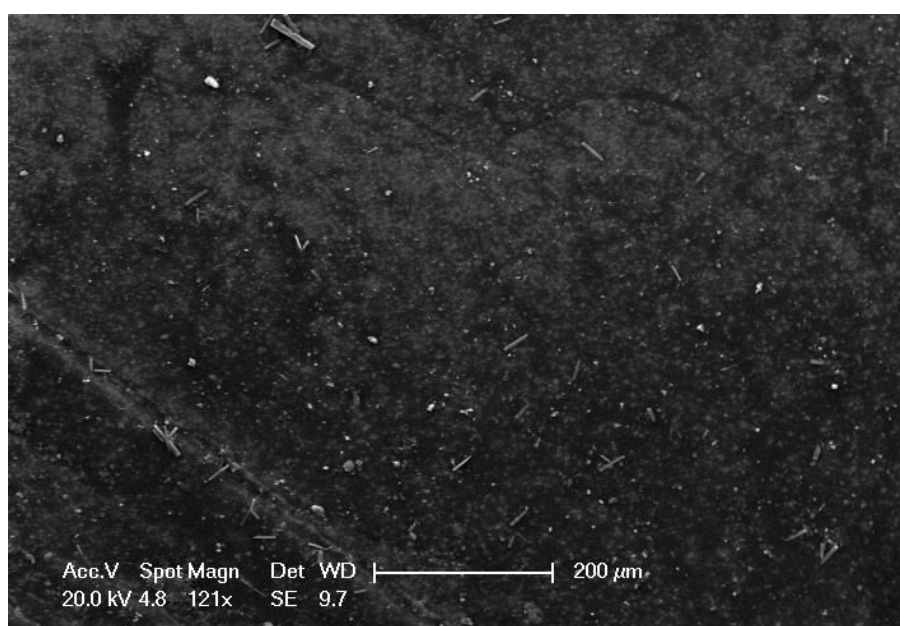


Figure V.10 Micrographie MEB (121x) de l'échantillon UD₄ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 0,5 g/L) (vue globale)

La brushite cristallise dans cet échantillon principalement en forme de baguette de dimension maximale de 32,5 µm (voire figure V.11(a)), ou agrégée en forme de gerbe de dimension visiblement plus faible (soit 43 µm) que dans les échantillons précédents

(voir figure V.11(b)). Les deux micrographies révèlent une cristallisation hétérogène de brushite et d'apatite (granulations éparses). Quelques agrégats de brushite maclée et d'apatite sous forme de granulations sphériques, sont observés (voir figure V.11(c)).

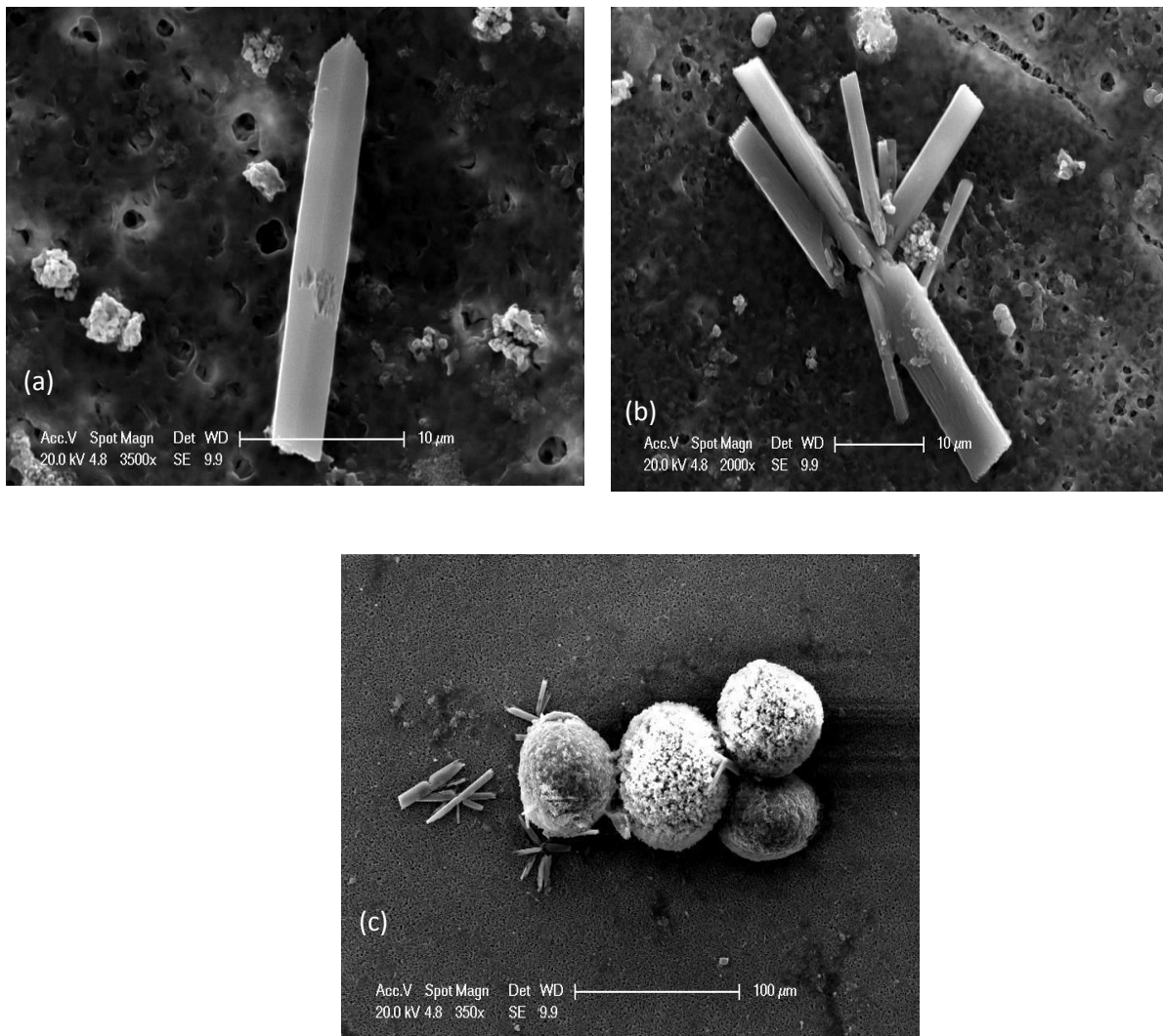


Figure V.11 Micrographie MEB de l'échantillon UD₄ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 0,5 g/L). (a) : cristallisation de brushite en forme de baguette associée à de l'apatite ; (b) : cristaux asymétriques de brushite agrégés (en forme de gerbe) ; (c) : agrégat de macles de brushite et un amas de granulations sphériques d'apatite.

■ V.2.1.2.5 Echantillon UD₅ : en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* L à la concentration (C₅= 1g/L)

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UD₅ testé à 37°C.

Tableau V.6 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD₅ (en présence de l'extrait de *Phoenix dactylifera* L, à 1g/L)

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation		
		Initial	Après 2h	Final
pH (à 37°C)	6,51	6,69	6,66	6,71

V.2.1.2.5.a Analyse par microscopie électronique à balayage

La cristallisation des phosphates calciques, en présence d'extrait des noyaux de dattes à 1 g/L, montre une abondance de brushite et de granulations sphériques. Cependant, l'abondance et la taille des granulations sphériques d'apatite sont plus élevées dans cet échantillon comparé à celles des échantillons précédents (voir figure V.12). Cela est prévisible puisque le pH de la solution après 6h de réaction, avant de procéder à la filtration, est >6.5 (le plus élevé de tous les échantillons), ce qui est favorable à la précipitation de la carboxapatite ou le PACC.

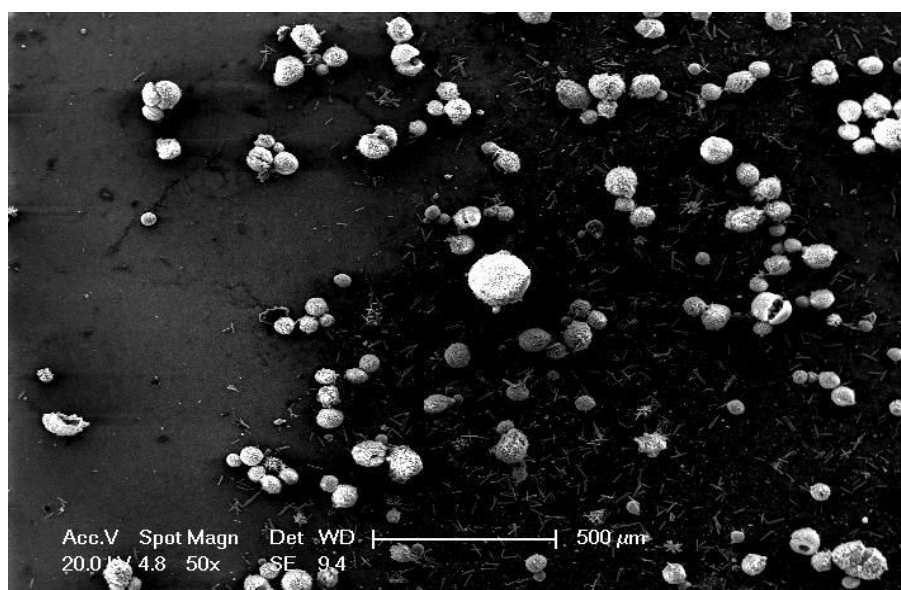


Figure V.12 Micrographie MEB (50x) l'échantillon UD₅ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 1 g/L) (vue globale)

Examinés de plus près, les granulations sphériques ressemblent en fait à des « cocons » (voir figure V.13(a)), où se logent d'autres sphérules d'apatite. Ces dernières sont entourées d'un cortex formé par un amas d'innombrables petites sphérules faisant apparaître, quelques fois, des formes en aiguilles faisant rappeler la forme de cristallisation de la brushite (voir figure V.3).

Nous notons aussi la présence de macles de brushite et des granulations d'apatite, de taille maximale de 444 μm et 63 μm , respectivement (voir figure V.13(b)). Des agrégats de cristaux de brushite en aspect de gerbe (de taille maximale de 53 μm) et de granulations d'apatite sont observés comme celui représenté dans la figure V.13(c).

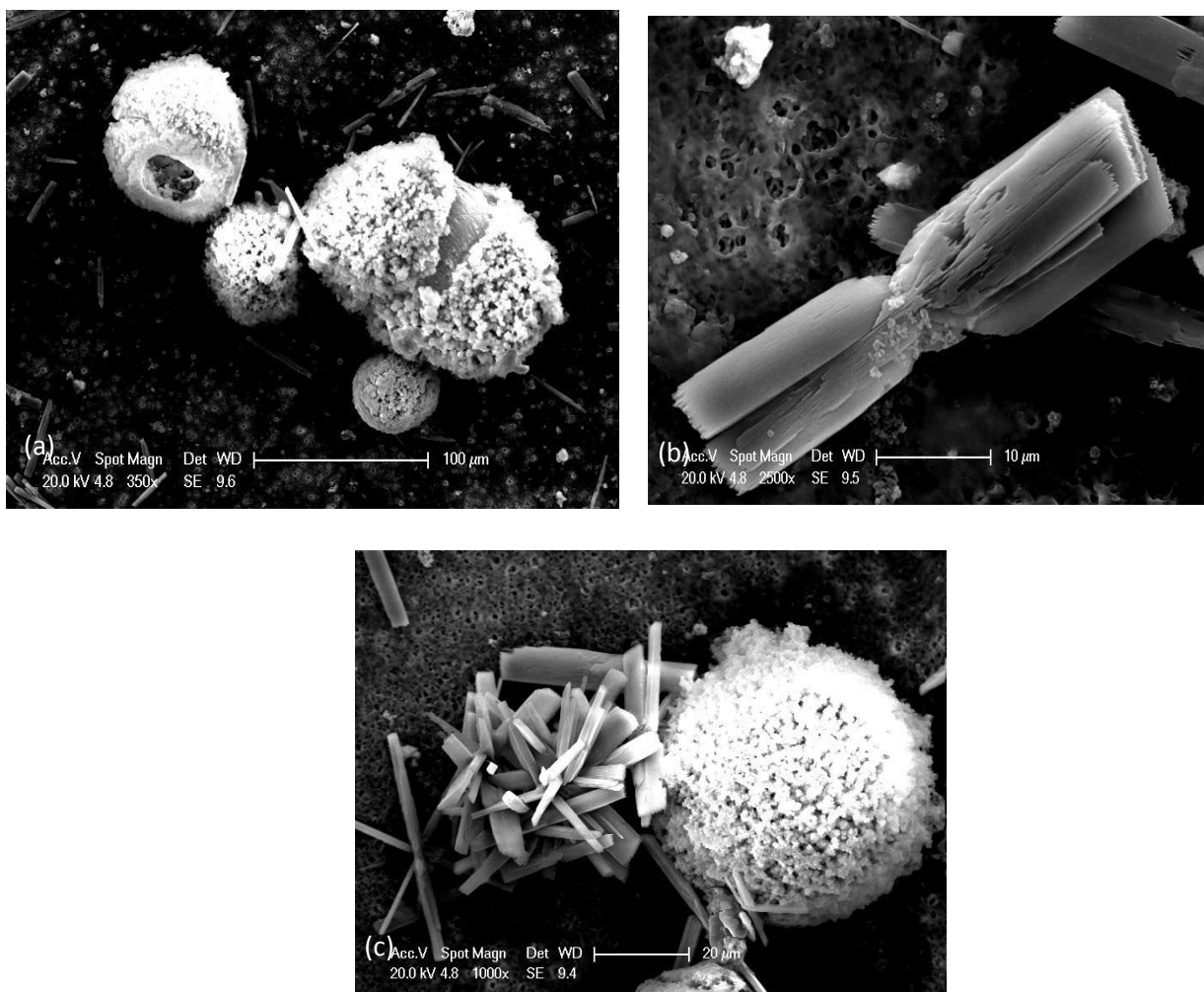


Figure V. 13 Micrographie MEB de l'échantillon UD₅ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 1 g/L à différents agrandissements. (a) : granulation d'apatite en sphérules ; (b) : macle de brushite ; (c) : agrégat de cristaux de brushite (aspect en gerbe) et un amas de granulations sphériques d'apatite

■ V.2.1.2.6- Echantillon UD₆ en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera L* à la concentration (C₆= 40g/L)

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UD₆ testé à 37°C.

Tableau V.7 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UD₆ (en présence de l'extrait de *Phoenix dactylifera L*, à 40 g/L

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation		
		Initial	Après 2h	Final
pH (à 37°C)	6,51	6,45	6,47	6,53

V.2.1.2.5.a Analyse par microscopie électronique à balayage

A plus forte concentration (40 g/L) (concentration de la solution mère) en extrait de noyaux de dattes, la cristallisation des phosphates calciques est très faible. En effet, l'analyse MEB (x50) de l'échantillon, montre, à priori, la présence de quelques granulations d'apatite (voir figure V.14).

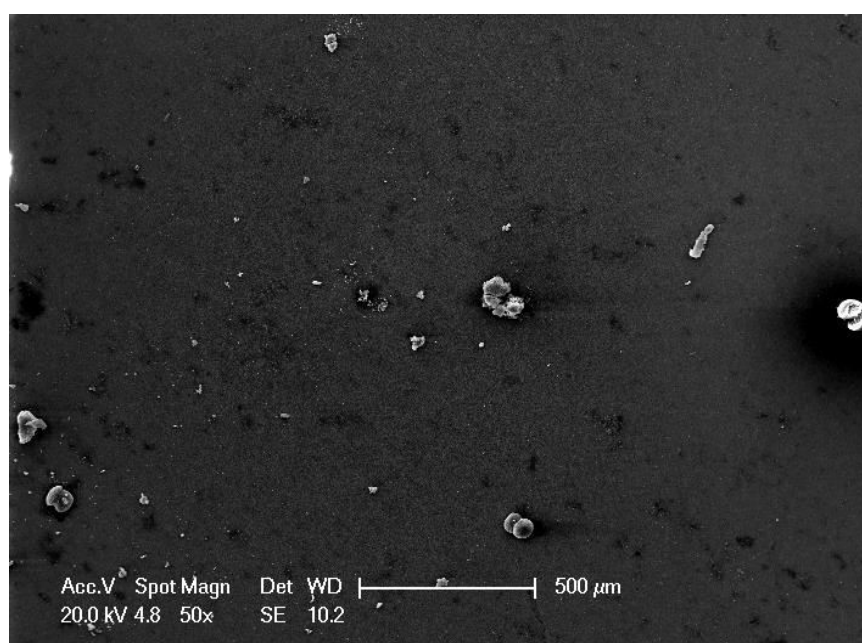


Figure V.14 Micrographie MEB (50x) de l'échantillon UD₆ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 40 g/L) (vue globale)

L'agrandissement de l'image à 350 fois montre la présence de rares granulations sphériques blanchâtre d'apatite (voir figure V.15(a),(b)). Alors qu'à plus fort agrandissement de l'image à 1500, nous observons, des cristaux asymétriques de brushite agrégés d'aspect en gerbe de 60,5 μm de longueur. Cet échantillon est presque exempt de brushite avec une faible abondance de granulations d'apatites.

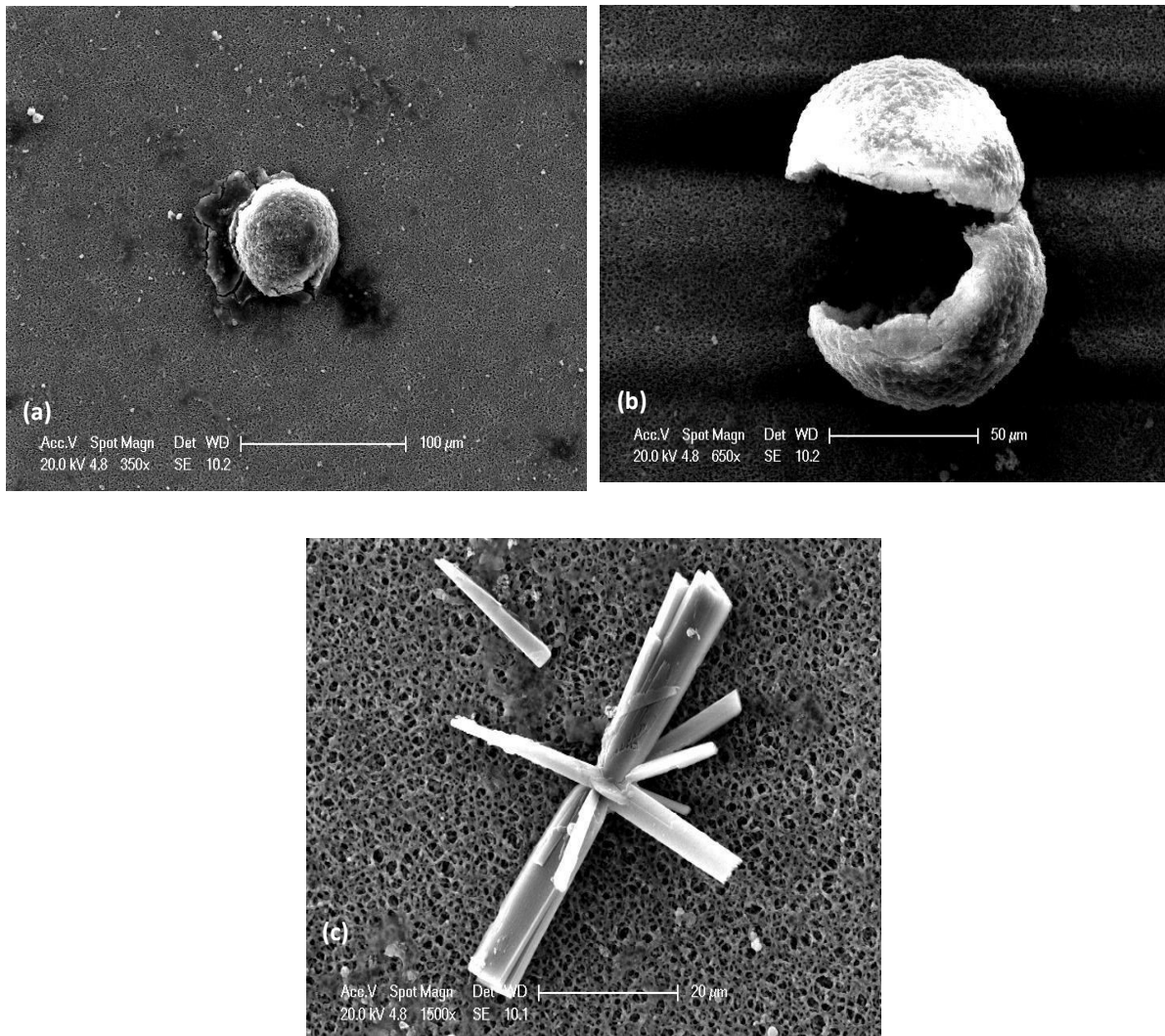


Figure V.15 Micrographie MEB de l'échantillon UD₆ (en présence d'extrait de noyaux de *Phoenix dactylifera* à 40 g/L à différents agrandissements. (a) : granulation d'apatite ; (b) : cortex d'une granulation sphérique d'apatite.

V.2.1.2.6.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Le dernier échantillon obtenu après filtration, étant presque exempt de brushite, il a été soumis à l'analyse par spectroscopie infrarouge afin de pouvoir caractériser les granulations blanchâtres d'apatite.

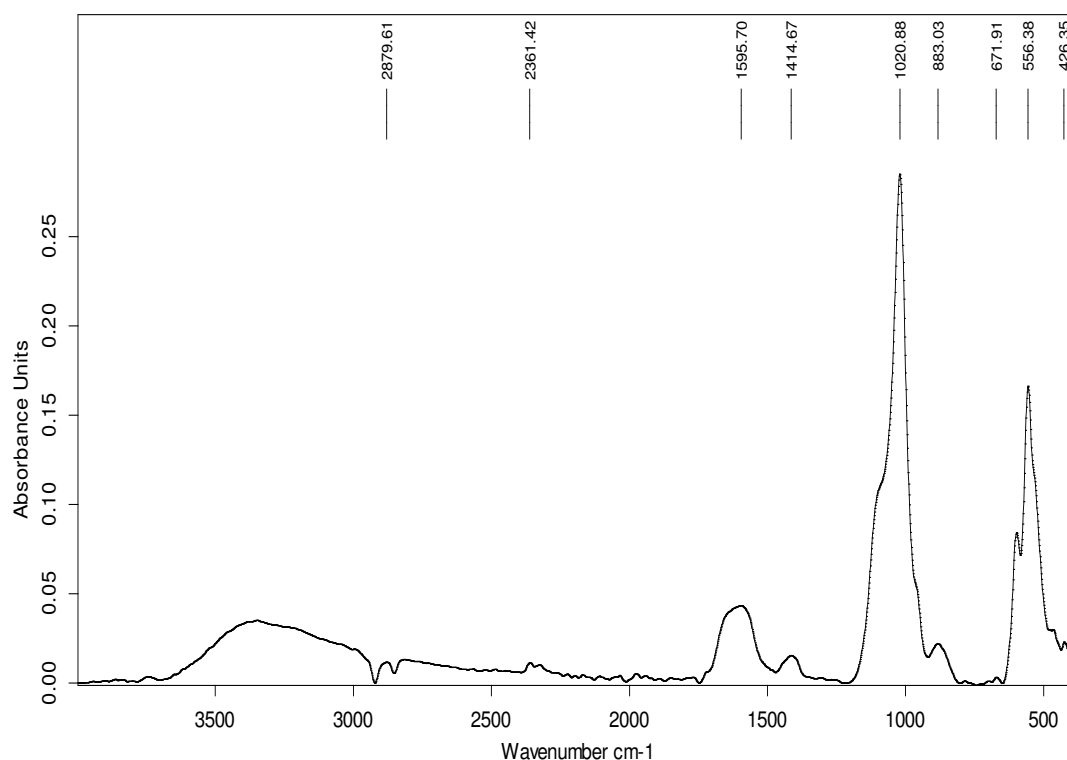


Figure V.16 : Spectre IR des granulations d'apatite

C:\Program Files\OPUS_65\MEAS\UH5.0 UH5 ATR platinum Diamond 1 Refl

17/04/2012

En effet, la bande des PO_4^{3-} à 1020.92 cm^{-1} asymétrique à gauche, large et épaulée vers 1100 cm^{-1} , ainsi que les vibrations secondaires pointues à 596.47 et 555.71 cm^{-1} , identifiées dans le spectre IR (spectre V.1), sont attribuées à la carbapatite.

V.2.1.3 Discussion

Le principal souci de cette étude est d'évaluer l'effet de la supplémentation des extraits de noyaux de dattes sur la cristallisation de la brushite, qui nous rappelons, est une espèce cristalline particulièrement lithogène, malgré sa faible fréquence dans les calculs et qui génère des calculs sévères, récidivants, durs et difficile à fragmenter par la lithotripsie. L'agrégation cristalline est considérée comme l'un des principaux

facteurs de formation des lithiases. Dans le cas de cette étude, les grands agrégats observés dans les micrographies MEB, peuvent être retenus par le rein et altérer l'épithélium tubulaire ou papillaire par rétention cristalline (Daudon et al, 2008), notamment en absence ou à faibles concentrations des infusions testées où une forte abondance de cristaux de brushite de tailles élevées et de volumineux agrégats ont été observés, pouvant témoigner d'un risque lithogène accru. Globalement, les observations par microscopie électronique à balayage, nous ont permis d'apprécier l'effet inhibiteur des extraits concentrés de noyaux de « *Phoenix dactylifera L* » vis-à-vis de la cristallisation de la brushite. En effet, à partir de la concentration de 0,5 g/L de l'extrait, l'abondance des cristaux de brushite est moindre comparée à celle des échantillons en présence d'extraits de dattes à (0,0625 ; 0,125 et 0,25) g/L. Cette faible abondance en brushite est en faveur de la formation de la carbapatite. Aussi, nous avons opté pour la mesure de l'évolution spontanée du pH correspondant à la cristallisation de la brushite, induite dans des échantillons identiques d'urine (provenant des urines de 24h d'un même sujet masculin sans antécédents lithiasiques), en présence de différentes concentrations d'extraits de noyaux de *Phoenix dactylifera*. La cristallisation de la brushite, en milieu urinaire étudié, s'est accompagnée de la précipitation d'apatite, identifiée par spectroscopie infra rouge, comme phosphate de calcium carbonaté sous la forme cristalline carbapatite. Un pH supérieur à 6,5 s'accompagne fréquemment de la précipitation de phosphate de calcium carbonaté sous forme cristalline (carbapatite) ou amorphe (phosphate amorphe de calcium carbonaté PACC) (Zerifi et al, 2008).

En effet, le pH initial du milieu urinaire était de 6,5 et a légèrement augmenté après y avoir induit la cristallisation de la brushite, justifiant ainsi la précipitation spontanée de la carbapatite.

L'interprétation de certaines micrographies témoigne d'une probable conversion de la brushite vers la carbapatite, espèce thermodynamiquement plus stable. Une autre observation d'un intérêt fondamentale dans la phytothérapie, c'est la quasi disparition des cristaux de brushite en présence des extraits de noyaux de dattes à 40 g/L, malgré le milieu induit en brushite. A cette concentration, l'infusion de noyaux de dattes

s'avère posséder un potentiel inhibiteur très important vis-à-vis de la brushite. Cette propriété inhibitrice est en faveur de corroborer le savoir traditionnel et pourrait être très intéressante dans la prévention des lithiases de brushite.

Cependant, les observations obtenues dans la présente étude expérimentale peuvent orienter les investigations cliniques vers des évaluations relevantes in vivo, qui apporteront des éléments pratiques, afin de déterminer la dose optimale pour une efficacité clinique optimisée.

Au terme de cette étude, il ressort que la taille des cristaux et agrégats de cette espèce lithogène sont élevés, dans le modèle urinaire étudié, et cela en absence ou en présence des extraits aqueux dilués de noyaux de *Phoenix dactylifera L.* A l'inverse, aux concentrations élevées (0,5 et 1) g/L, la cristallisation de la brushite évolue vers celle de la carapatite, ce qui réduit son agrégation, son abondance, ainsi que la taille cristalline. Mais cet effet modérément inhibiteur, n'est pas particulièrement significatif dans le risque lithogène lié à la brushite tant qu'on observe toujours une abondante cristallisation d'agrégats qui peuvent être retenus par le rein et altérer l'épithélium tubulaire ou papillaire par rétention cristalline ou encore peuvent être précurseur de calculs calciques, en urine hypercalciurique.

Une dernière observation, est l'action de l'extrait des noyaux de dattes à 40 g/L qui réduit efficacement la cristallisation de la brushite. Les noyaux de dattes sont caractérisés par une richesse en fibres qui peuvent équilibrer l'absorption de certains nutriments potentiellement impliqués dans les processus de cristallisation. Néanmoins, il serait très intéressant de tester cet extrait concentré de noyaux de dattes dans un modèle in vivo pour affirmer et appuyer cette vertu qui peut être d'un intérêt fondamentale pour la phytothérapie.

V.2.2 Etude de l'effet de *Malus pumila*

V.2.2.1. Cristallisation de la brushite dans l'urine, en absence des extraits aqueux de *Malus pumila* (échantillon de référence)

La même méthodologie est suivie pour tester l'effet inhibiteur de *Malus pumila* sur la cristallisation à 37°C des phosphates calciques, notamment la brushite, dans l'urine des 24h d'un sujet masculin sans antécédents lithiasiques. Le pH du milieu (~6.7) de précipitation des phosphates en absence des extraits aqueux de *Malus pumila* est resté presque constant durant la réaction (voir tableau V.8).

Tableau V.8 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en absence de l'extrait de *Malus pumila* (échantillon de référence)

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,70	6,73

V.2.2.1.a Analyse par microscopie électronique à balayage MEB

L'observation en microscopie électronique à balayage (MEB) des cristaux retenus dans le filtre de cet échantillon, illustrée dans la figure V.17 a révélé une très forte cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium dihydraté (brushite) en aiguilles épaisses ou en baguettes et de quelques granulations sphériques blanchâtres d'apatite.

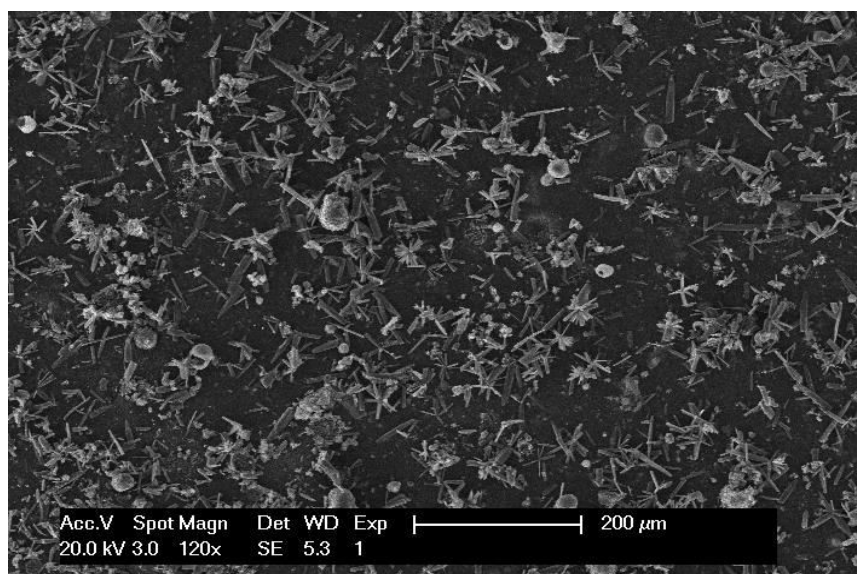


Figure V.17: Micrographie MEB (120x) de l'échantillon de référence (sans inhibiteur) (vue globale)

L'agrandissement à 1500× de la micrographie de l'échantillon de référence (URef), révèle la présence de granulations sphériques blanchâtres d'apatite en cristallisation hétérogène, sur des cristaux de brushite agrégés radialement d'aspect d'oursin de taille moyenne de 42,1µm (voir figure V.18(a)). D'autre part, l'observation des micrographies agrandies à 1000× et 1500× montre la présence des granulations sphériques blanchâtres d'apatite, isolées et parfois en amas, de taille maximale de 48,33µm (voir figure V.18(b)). Ces granulations sphériques d'apatite forment des agrégats hétérogènes avec les cristaux de brushite en forme de croix (voir figure V.18(c)).

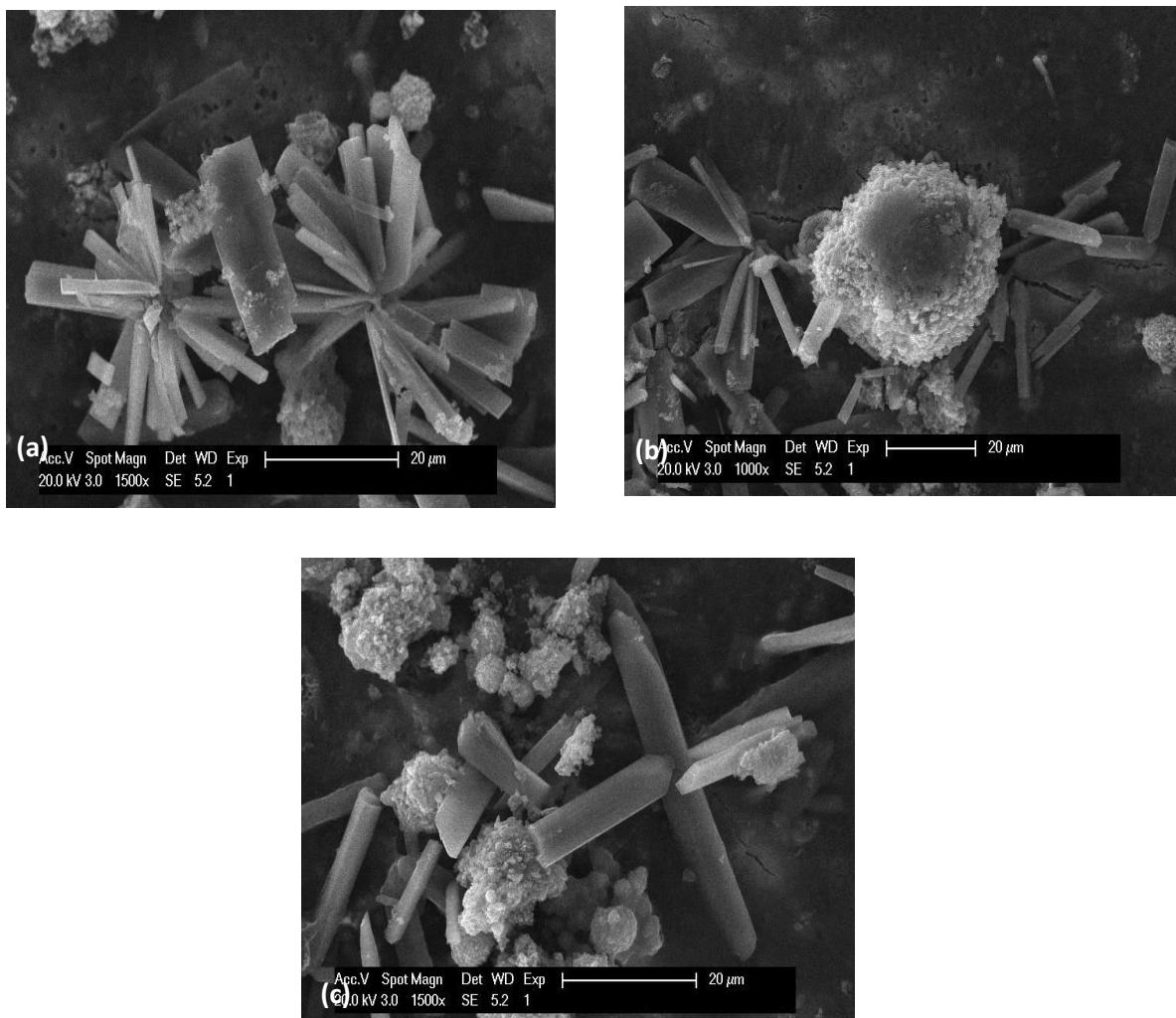


Figure V.18: Micrographies MEB de l'échantillon de référence, à différents agrandissements. (a) : des cristaux de brushite agrégés d'aspect d'oursin ; (b) : des cristaux de brushite et des granulations blanchâtres d'apatite ; (c) : des cristaux de brushite en cristallisation hétérogène avec des granulations d'apatite

V.2.2.1.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

L'échantillon de référence a été soumis à l'analyse par spectroscopie infrarouge afin de caractériser les granulations blanchâtres d'apatite (voir spectre IR illustré dans la figure V.19).

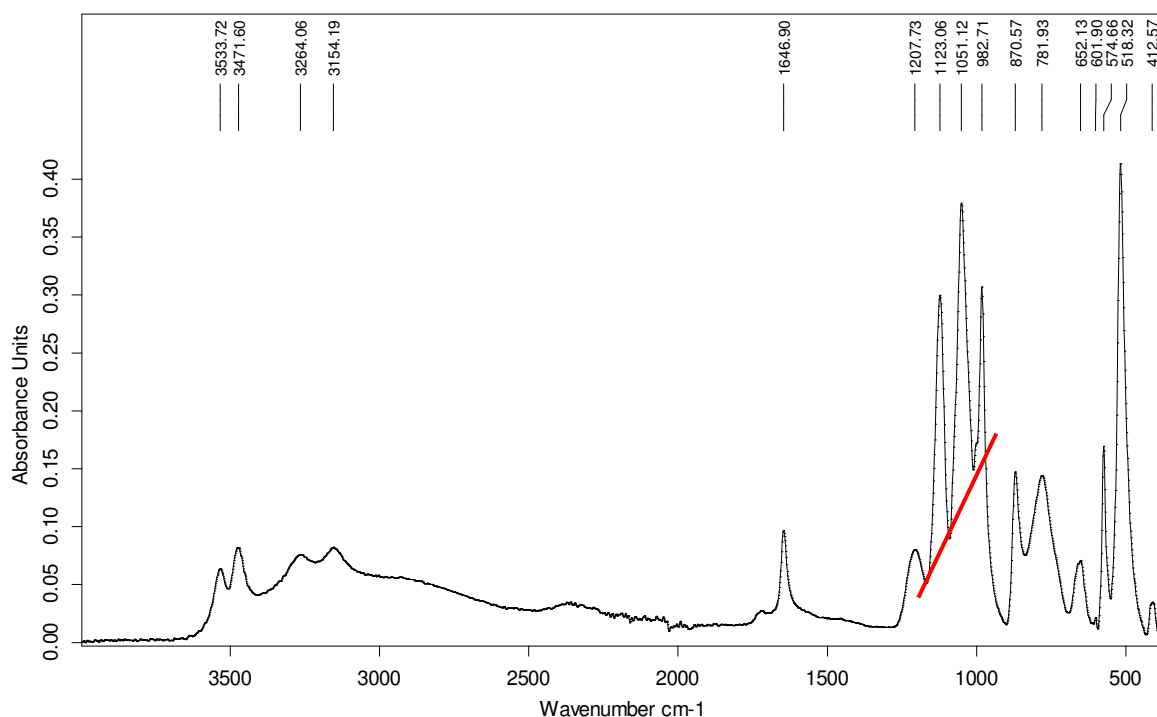


Figure V.19 : Spectre IR de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante)
F:\Benyoucef\U Réf.2 U Réf Instrument type and / or accessory 27/02/2014

La brushite a été identifiée comme espèce prédominante dans le précipité. En effet, nous observons des bandes caractéristiques de la brushite : valence de vibration des molécules d'eau à 3633.72 et à 3471.80 cm^{-1} (bande bifide). Un ensemble de bandes en triplet à 1123.06, 1051.12 et 982.71 cm^{-1} attribué à la vibration de valence des ions phosphates. L'allure du triplet et la petite bande clé à 601, sont attribués à la présence de carapatite en traces.

V.2.2.2 Cristallisation de la brushite dans l'urine, en présence des extraits aqueux de « *Malus pumila* »

■ V.2.2.2.1. Echantillon UP₁, en présence d'extrait aqueux de *Malus pumila* à la concentration C₁= 0,0625g/L :

La cristallisation de la brushite a été induite en milieu urinaire, selon le procédé décrit dans la méthodologie. Les valeurs du pH mesuré, sont résumées dans le tableau V.9

Tableau V.9 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP₁ (en présence de l'extrait de *Malus pumila*, à 0,0625 g/L

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,70	6,73

V.2.2.2.1.a Analyse par microscopie électronique à balayage

L'observation en microscopie électronique à balayage (MEB) des cristaux retenus dans le filtre contenant cet échantillon, est illustrée dans la figure V.20, et a révélé une très forte cristallisation d'apatite, sous forme de granulations éparses ou de granulations sphériques. A cette échelle d'agrandissement (voir figure V.20), les cristaux de brushite ne sont pas visibles.

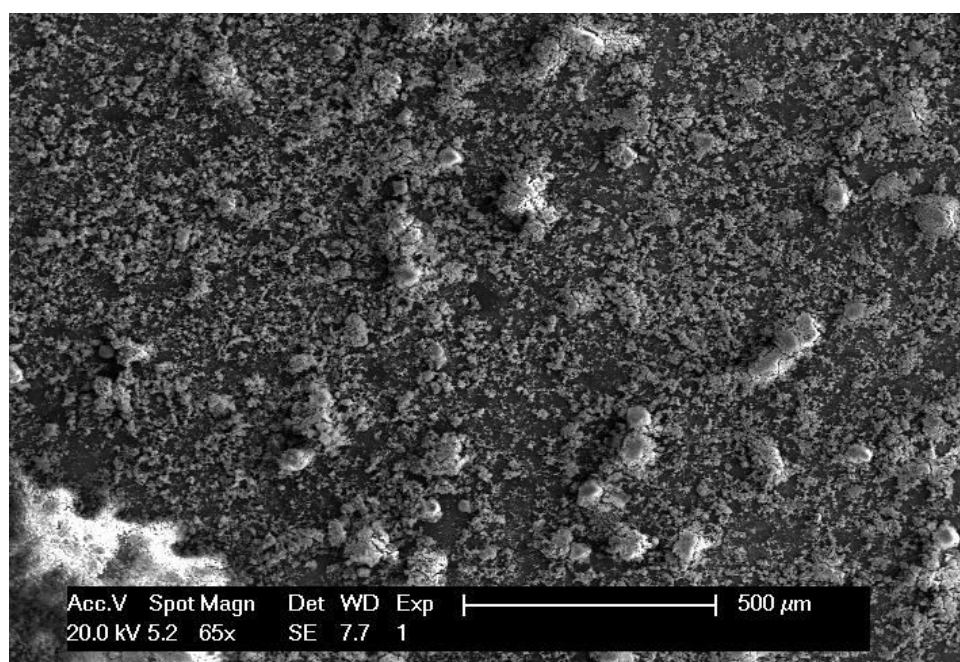


Figure V.20 : Micrographie MEB (65x) de l'échantillon UP1 (en présence d'extrait *Malus pumila* à 0,0625 g/L (vue globale)

L'agrandissement (1000x) de la micrographie de l'échantillon UP₁, révèle la présence de granulations sphériques blanchâtres de taille moyenne de 53,84 µm (voir figure V.21(a)). La figure V.21 (agrandissement à 2000x) illustre des granulations en sphérules d'apatite, en cristallisation hétérogène sur quelques cristaux de brushite en forme de baguette de taille maximale de 49,23µm (voir figure V.21(b)).

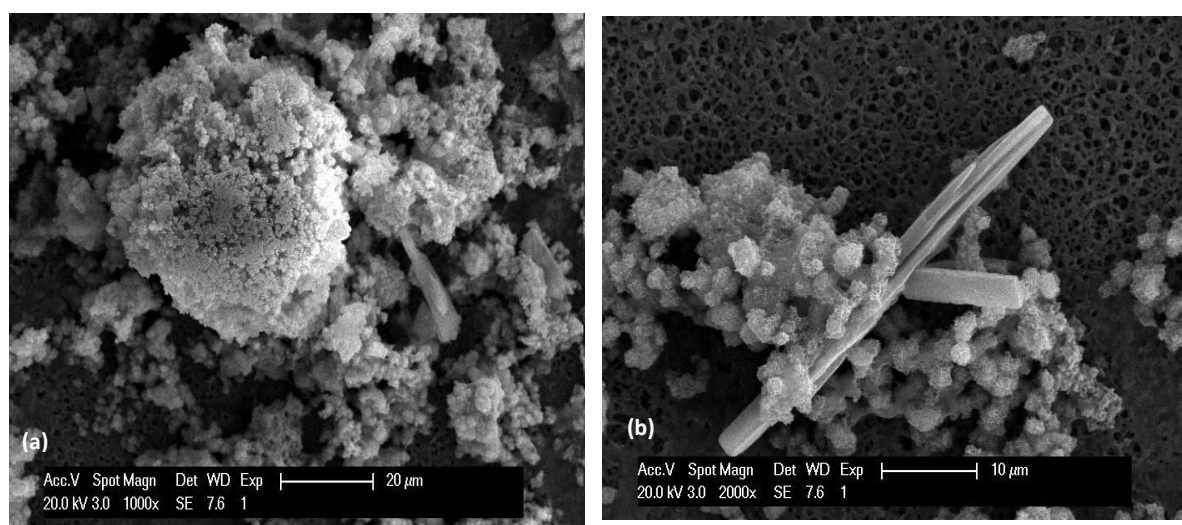


Figure V.21: Micrographies MEB de l'échantillon UP₁(en présence de l'extrait de *Malus pumila* à 0,0625g/L). (a) : Granulations sphériques d'apatite ; (b) : Cristaux de brushite en forme de baguette.

V.2.2.2.1.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

L'analyse spectrale du précipité recueilli à la fin de l'expérience et l'identification avec les spectres de référence et la présence des bandes caractéristiques montrent que les composés formés étaient principalement la carboxyapatite associée à des traces de brushite (voir figure V.22).

En effet, le spectre IR est caractéristique du phosphate de calcium carbonaté (carboxyapatite) dont les vibrations caractéristiques sont à 1416,76 cm⁻¹ (vibration des ions carbonates CO₃⁻²), à 1010.90 cm⁻¹ asymétrique à gauche (vibration de valence des ions phosphates PO₄⁻³). Toutefois l'épaule à 1130 cm⁻¹, témoigne de la présence de la brushite à l'état de traces.

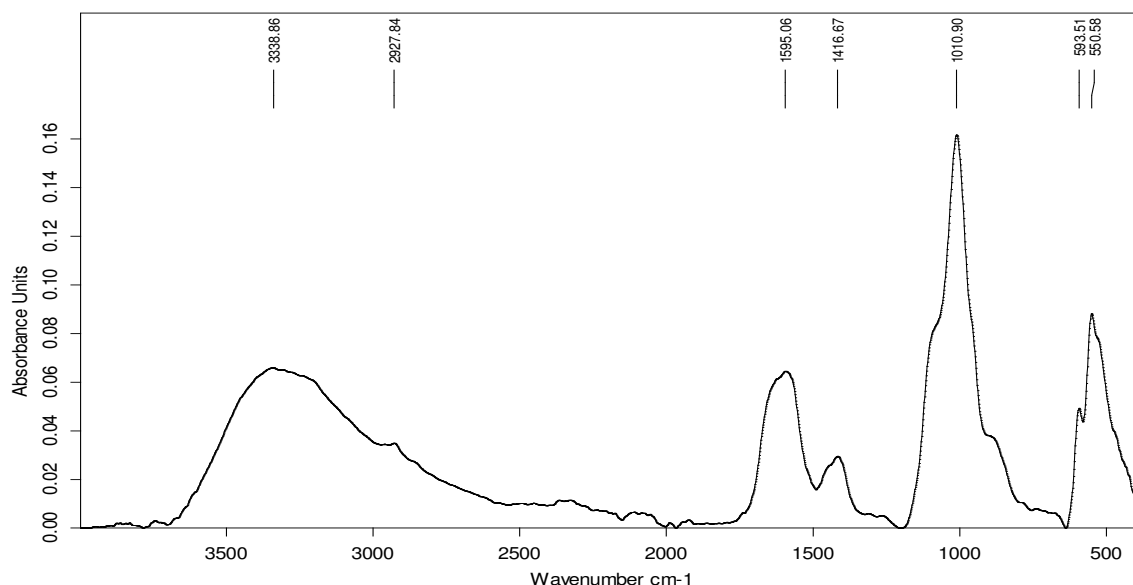


Figure V.22 : Spectre IR de l'échantillon UP1

Seite 1 von 1

■ V.2.2.2.2. Echantillon UP₂, en présence d'extrait aqueux de *Malus pumila* à la concentration C₂= 0.125g/L :

Des mesures du pH de milieu de cristallisation ont été faites au début et à la fin de l'expérience à 37 C⁰ (voir tableau V.10).

Tableau V.10 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP₂ (en présence de l'extrait de *Malus pumila*, à 0,125 g/L

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,67	6,69

V.2.2.2.2.a Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence de l'extrait de *Malus pumila* à 0,125g/L, l'image MEB de l'échantillon est illustrée dans la figure V.23 et révèle une cristallisation importante d'apatite.

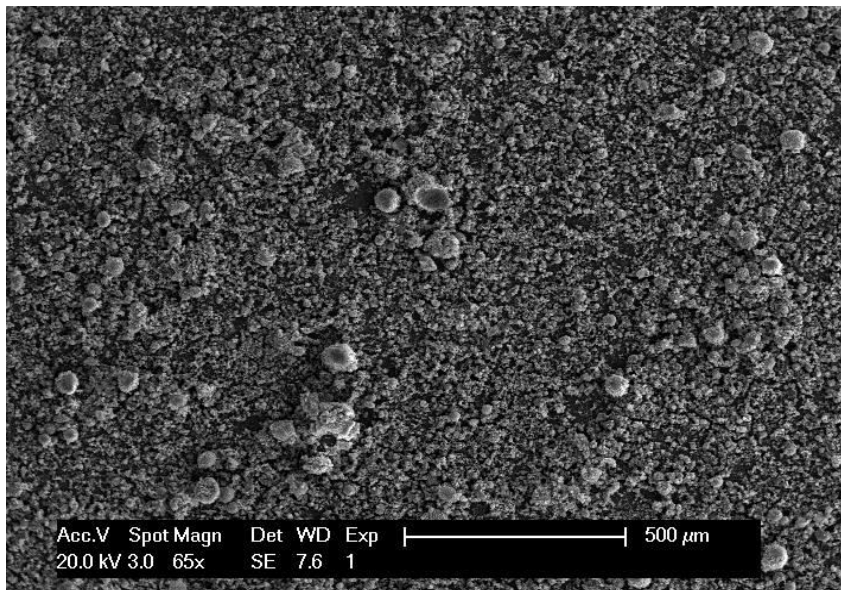


Figure V.23: Micrographie MEB (65x) de l'échantillon UP₂ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à 0,125 g/L) (vue globale)

Examinés de plus près (agrandissement 500x), les granulations sphériques ressemblent à des « cocons », où se logent d'autres sphérules de carapatite (voir figure V.24(a) et (b)). Ces dernières sont entourées d'un cortex (voir figure V.24(b)) formé par un amas d'innombrables petites sphérules. Quelques aiguilles de brushite sont aussi observées.

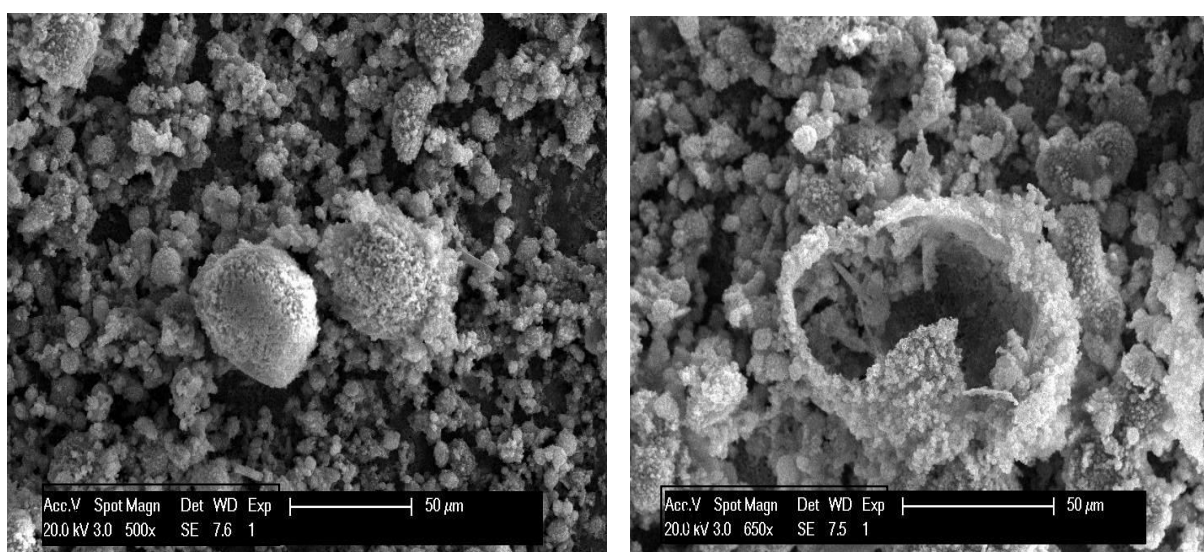


Figure V.24: Micrographies MEB de l'échantillon UP₂ (en présence de l'extrait de *Malus pumila* à 0,125g/L). (a) : Granulations sphériques d'apatite ; (b) : Cortex d'une granulation sphérique d'apatite.

V.2.2.2.2.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

L'analyse spectrale de l'échantillon UP₂ obtenu à la fin de la cristallisation des phosphates calciques en présence de l'extrait de *Malus pumila* à la concentration C₂ = 0,125g/L confirme la précipitation des phosphates sous forme de carbonate apatite (carbapatite).

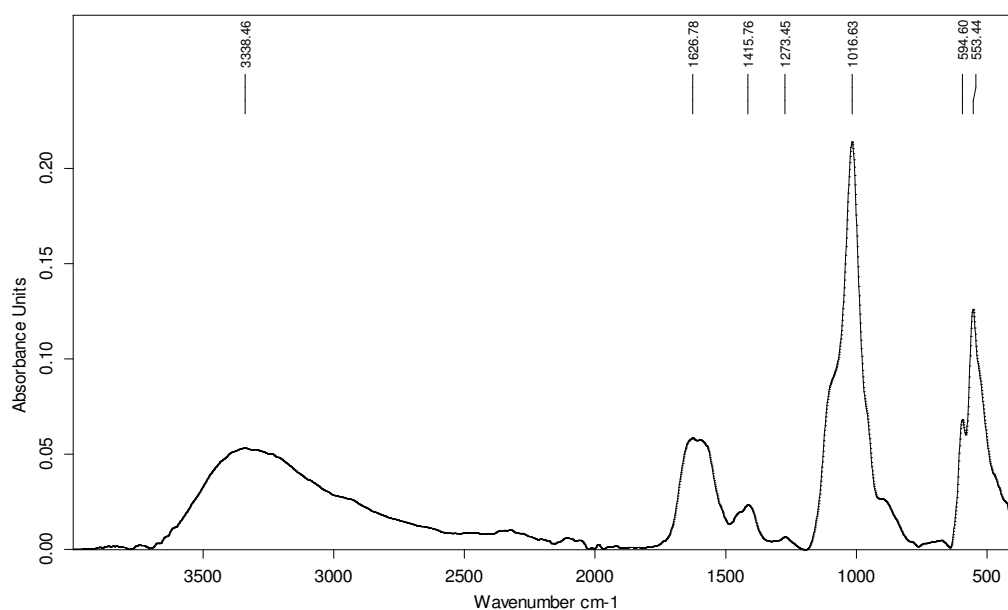


Figure V.25: Spectre IR de l'échantillon UP₂

Le spectre IR est caractéristique du phosphate de calcium carbonaté (carbapatite) dont les vibrations caractéristiques sont à 1415,76 cm⁻¹ (vibration des ions carbonates CO₃⁻²), à 1016,63 cm⁻¹ asymétrique à gauche (vibration de valence des ions phosphates PO₄⁻³). Toutefois l'épaule à 1130 cm⁻¹ et la bande à 553,44 cm⁻¹, témoignent de la présence de la brushite à l'état de traces.

■ V.2.2.2.3 Echantillon UP₃, en présence d'extrait aqueux de *Malus pumila* à la concentration C₃= 0,25g/L

Les valeurs de pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration 0,25 g/L sont illustrées dans le tableau V.11.

Tableau V.11 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP₃ (en présence de l'extrait de *Malus pumila*, à 0,25 g/L

Le milieu	L'urine	Milieu de cristallisation
-----------	---------	---------------------------

	Initiale	Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,65	6,66

V.2.2.2.3.a Analyse par microscopie électronique à balayage

La cristallisation des phosphates calciques, en présence d'extrait de *Malus pumila* à 0,25g/L (échantillon UP₃), montre une abondance de granulations sphériques d'apatite et de granulation d'apatite en amas (voir figure V.26).

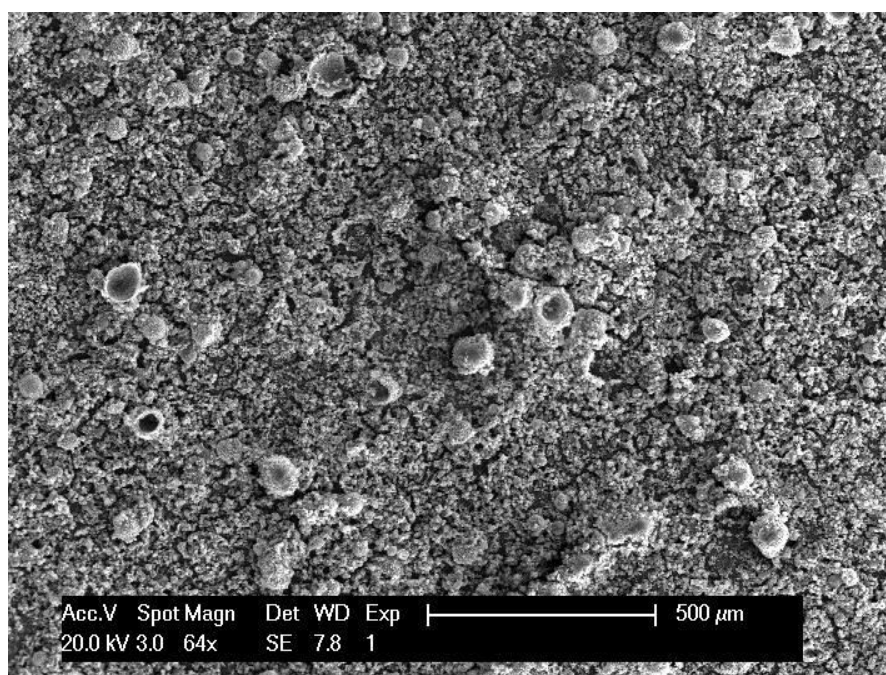


Figure V.26: Micrographie MEB (64x) de l'échantillon UP₃ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à 0,25 g/L) (vue globale)

L'agrandissement à 1500x, montre la présence de granulations sphériques blanchâtres d'apatite et des cristaux de brushite agrégés radialement d'aspect en oursin de taille de 45,26µm (voir la figure V.27(a)). Nous notons aussi la présence d'agrégats de brushite formés de cristaux de brushite en macles et en forme de baguettes, entourés par des sphérules d'apatite (voir la figure V.27(b)). A plus fort agrandissement de l'image (2000x), nous observons une cristallisation hétérogène des macles de brushite et de granulations d'apatite (voir la figure V.27(c), (d)).

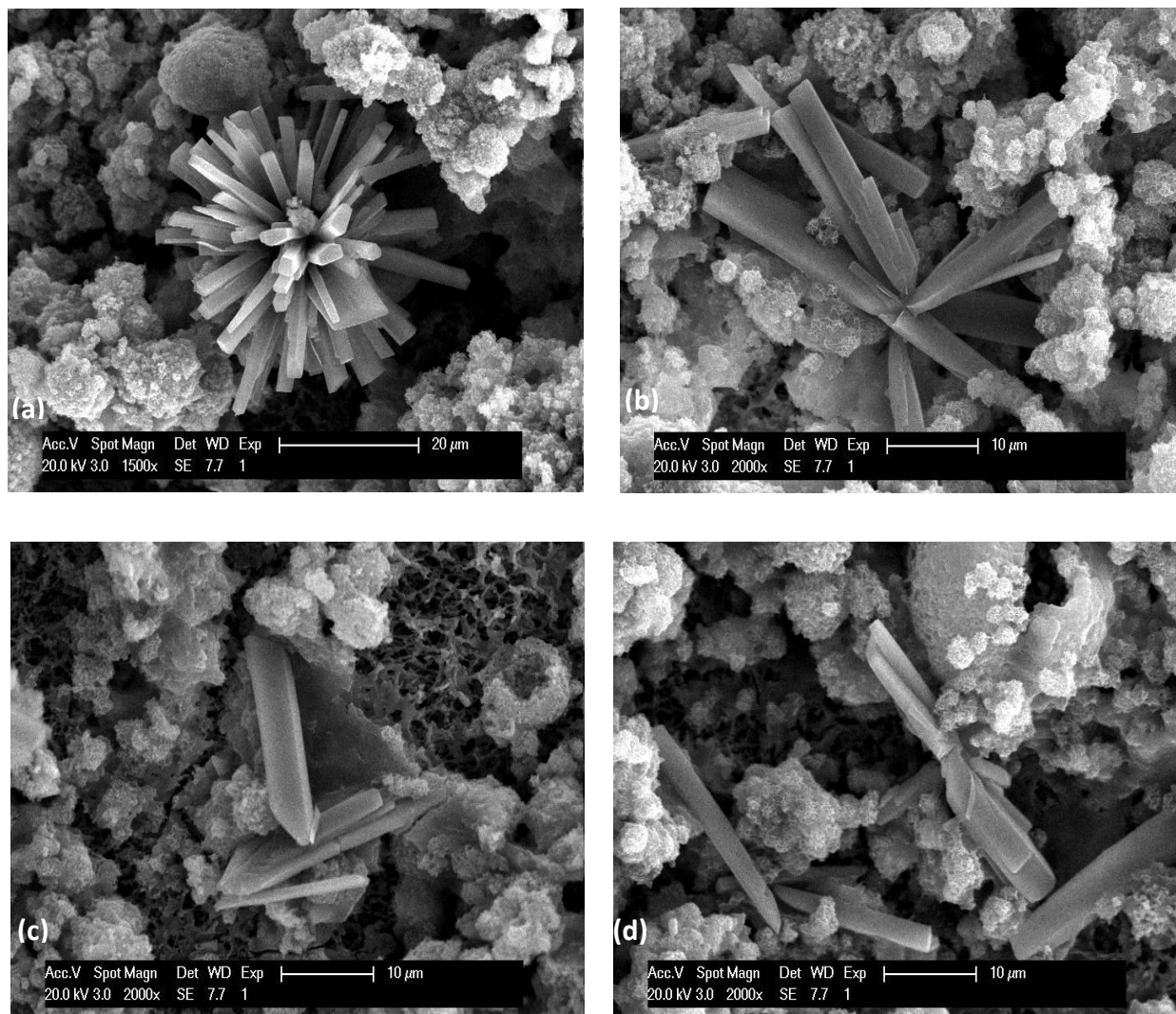


Figure V.27: Micrographie MEB de l'échantillon UP₃ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à 0,25g/L), à différents agrandissements. (a): agrégat de brushite d'aspect en oursin ; b : macles de brushite agrégés ; (c) : agrégats de cristaux maclés de brushite ; (d) : cristallisation hétérogène de brushite agrégés et d'apatite.

V.2.2.2.3.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

L'analyse spectrale du précipité recueilli à la fin de l'expérience et l'identification avec les spectres de référence et la présence des bandes caractéristiques montrent que les composés formés étaient principalement la carboxypatite et la brushite (voir figure V.28).

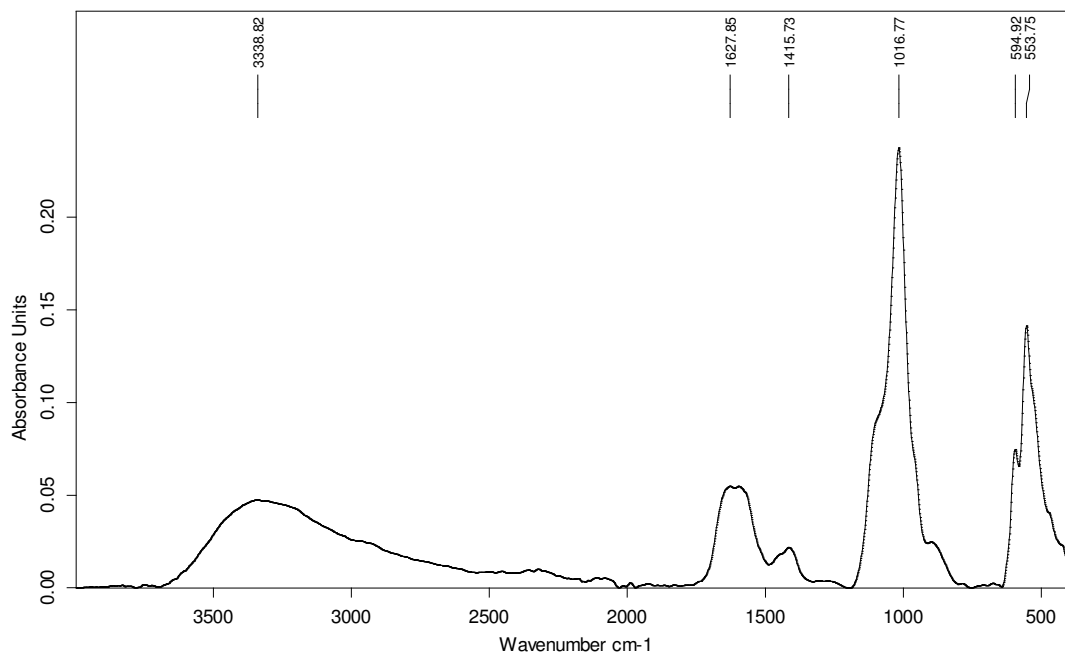


Figure V.28 : Spectre IR de l'échantillon UP₃

Le spectre IR est typique du phosphate de calcium carbonaté (carapatite) dont les vibrations caractéristiques sont à 1415,73 cm⁻¹ (vibration des ions carbonates CO₃⁻²), à 1016,77 cm⁻¹ asymétrique à gauche (vibration de valence des ions phosphates PO₄⁻³). L'épaule faible à droite de la bande à 1016,77 et la bande à 553,75 cm⁻¹ sont attribuées à la présence de la brushite.

■ V.2.2.2.4. Echantillon UP₅, en présence d'extrait aqueux de *Malus pumila* à la concentration C₅= 1g/L

Les valeurs de pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration 1 g/L sont illustrées dans le tableau V.12.

Tableau V.12 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP₅ (en présence de l'extrait de *Malus pumila*, à 1 g/L

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,66	6,64

V.2.2.2.4.a Analyse par microscopie électronique à balayage

L'observation en microscopie électronique à balayage (MEB) des cristaux retenus dans le filtre de cet échantillon, illustré dans la figure V.29, a révélé une importante cristallisation d'apatite.

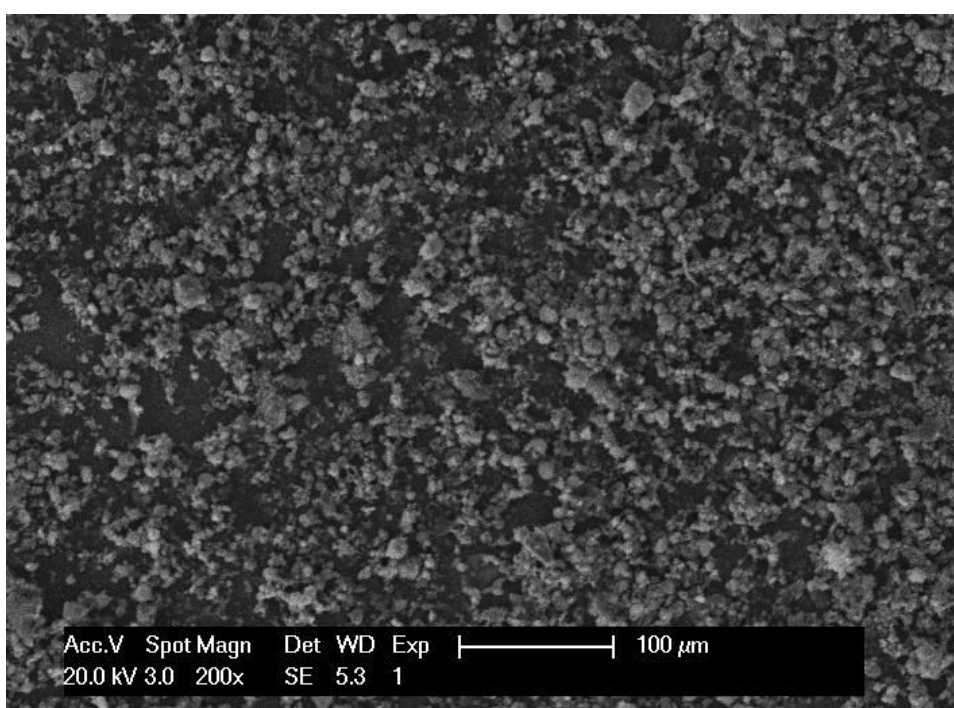


Figure V.29: Micrographie MEB (200x) de l'échantillon UP₅ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à 1g/L) (vue globale)

Cet échantillon, observé par MEB à 1000 × et 1500×, présente des agrégats de cristaux de brushite en forme de baguette et en forme de gerbe de taille maximale de 49,23µm (voir figure V.30(a)) et des sphérules d'apatite de taille maximale de 46,15µm (voir figure V.30(b)).

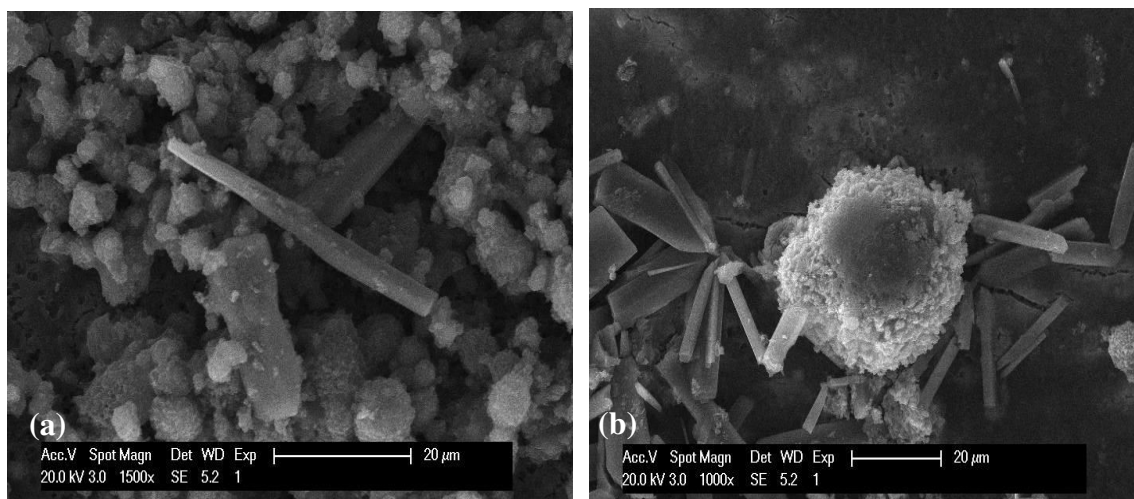


Figure V.30: Micrographie MEB de l'échantillon UP₅ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à 1g/L), à différents agrandissements. (a): cristaux de brushite en présence des granulations d'apatite ; (b): agrégats de brushite et des granulations sphériques blanchâtres d'apatite

V.2.2.2.4.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Le précipité formé dans l'urine après avoir induit une sursaturation de phosphate sous forme de brushite, a été soumis à l'analyse par spectroscopie infrarouge afin de pouvoir distinguer les espèces formées en fin de cristallisation. Le spectre obtenu est représenté dans la figure V.31.

La bande asymétrique à $1018,11\text{cm}^{-1}$, large et épaulée à 1150cm^{-1} est attribuée à la valence des phosphates de la carboxyapatite. On note aussi la bande de valence de carbonates à $1415,88\text{cm}^{-1}$. L'hydrogénophosphate de calcium dihydraté (brushite) est présente comme une espèce secondaire. Cependant, un épaulement au voisinage de 1100cm^{-1} et des bandes à $1641,73$ et $554,17\text{cm}^{-1}$ sont attribuées à la brushite.

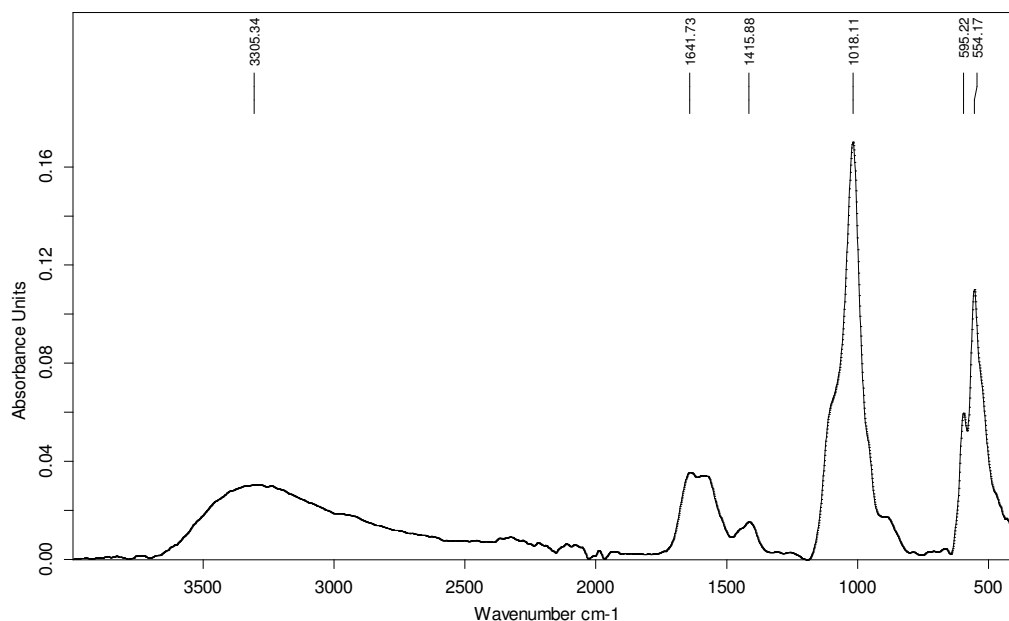


Figure V.31 : Spectre IR de l'échantillon UP₅

V.2.2.2.5. Echantillon UP₆, en présence d'extrait aqueux de *Malus pumila* à la concentration C₆= 40g/L

Les valeurs de pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de *Malus pumila* à la concentration 40 g/L sont illustrées dans le tableau V.13.

Tableau V.13 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UP₆ (en présence de l'extrait de *Malus pumila*, à 40 g/L).

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,57	6,60

V.2.2.2.5.a Analyse par microscopie électronique à balayage

A plus forte concentration (40g/L) de la solution mère en extrait de *Malus pumila*, la cristallisation des phosphates calciques donne des espèces cristallines phosphatiques semblables aux cristaux formés précédemment en présence d'extraits aqueux de *Malus pumila* à différents concentrations. L'analyse par microscopie électronique MEB de l'échantillon UP₆ montre une cristallisation très importante d'apatite sous forme de granulations sphériques blanchâtres d'apatite accompagnée de quelques cristaux de brushite.

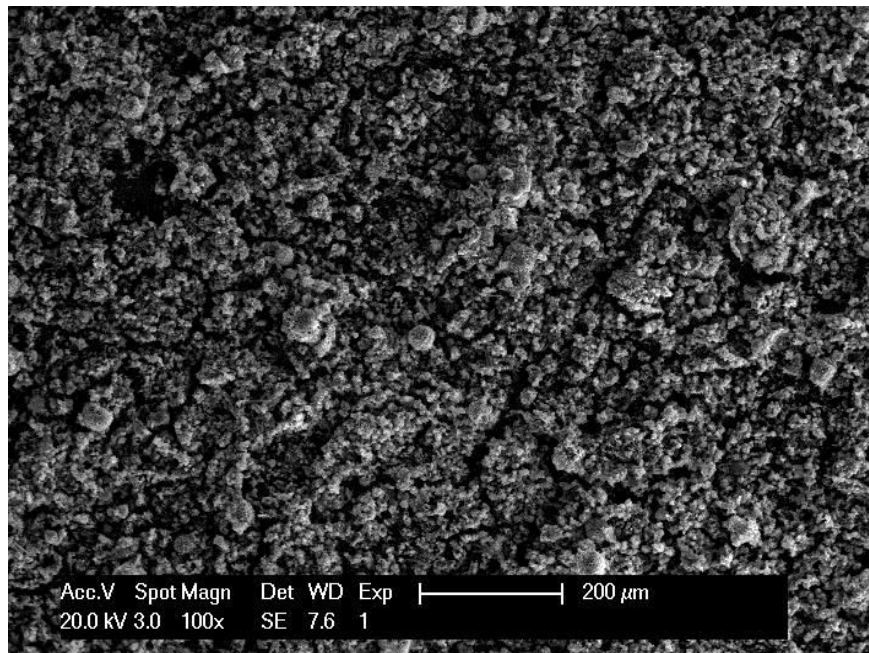
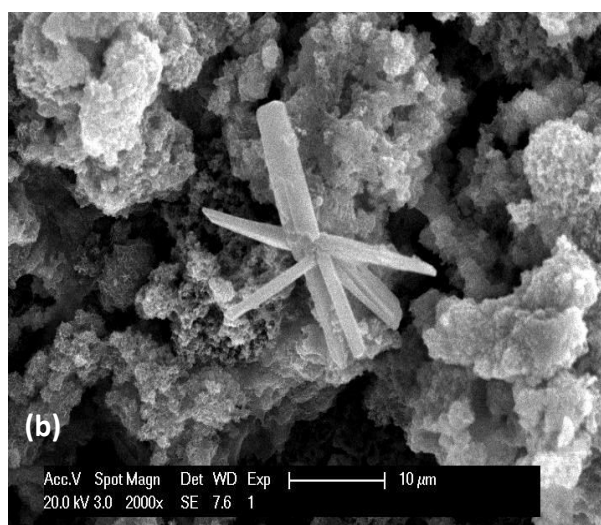
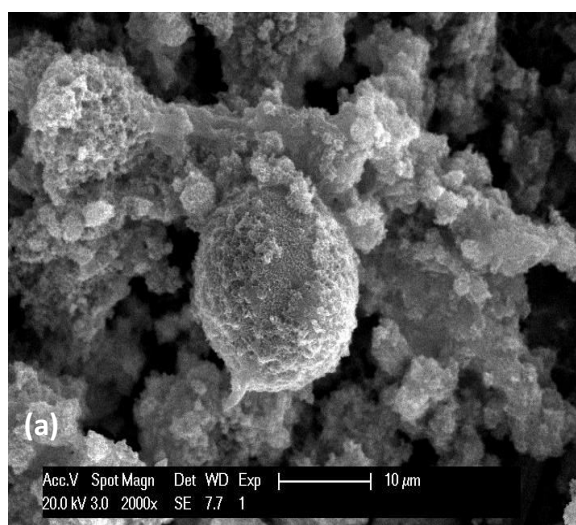


Figure V.32 Micrographie MEB (100x) de l'échantillon UP₆ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à 40 g/L) (vue globale)

Les micrographies illustrées dans la figure V.33 révèlent d'une part, la présence des granulations sphériques d'apatite, en amas de taille maximale de 20µm (voir figure V.33(a)), et d'autre part, une cristallisation hétérogène de granulations d'apatite sur des cristaux de brushite agrégés radialement, d'aspect en oursin (voir figure V. 33(b)), macle de cristaux de brushite agrégé accompagné par des granulations d'apatite (voir figure V. 33(c)).



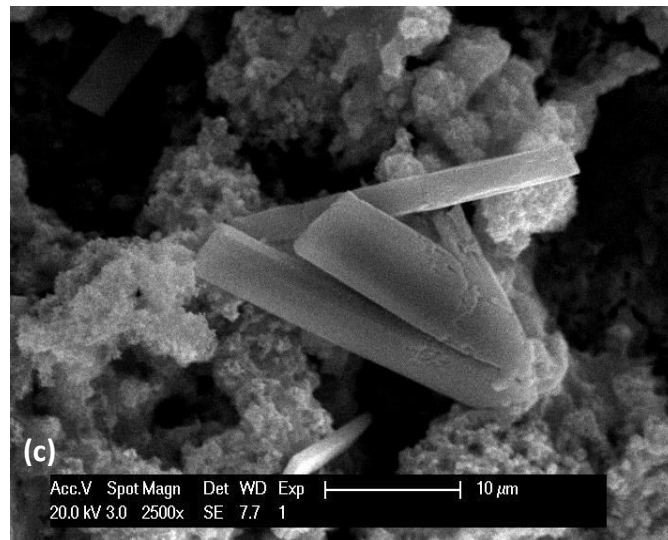


Figure V.33 Micrographie MEB de l'échantillon UP₆ (en présence d'extrait de *Malus pumila* à 40g/L), à différents agrandissements. (a) : granulations sphériques blanchâtres d'apatite ; (b) : cristallisation hétérogène d'apatite sur un agrégat de brushite d'aspect en oursin ; (c) : macle de cristaux de brushite agrégé accompagné par des granulations d'apatite

V.2.2.2.5.b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

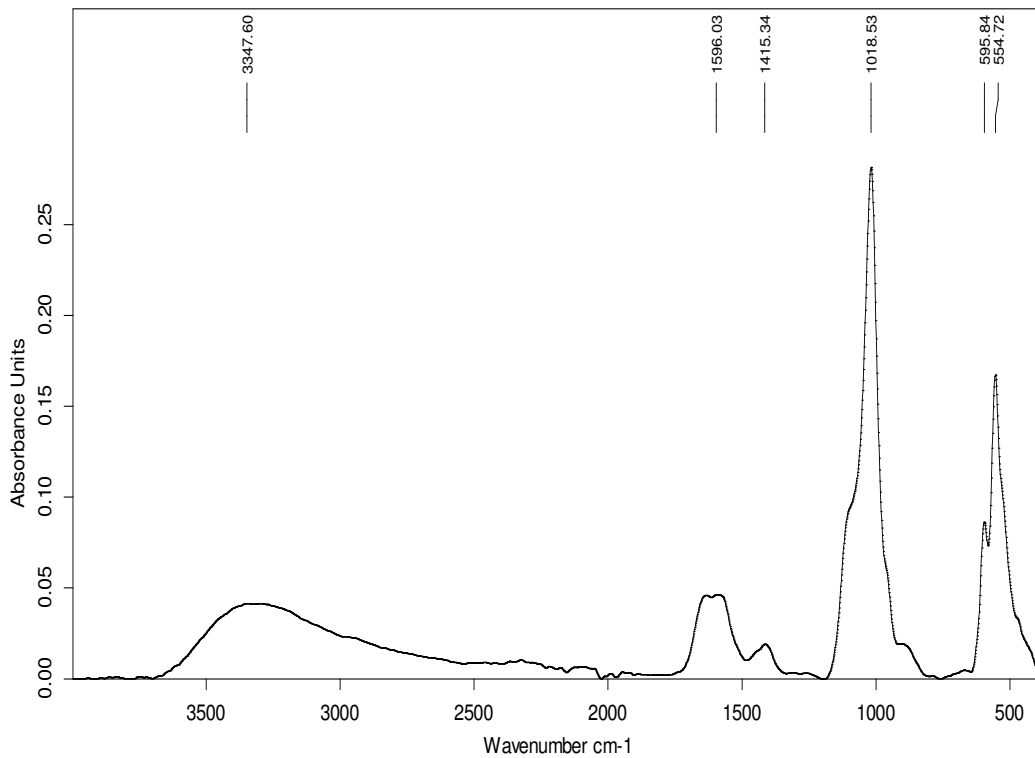


Figure V.34 : Spectre IR de l'échantillon UP₆

L'analyse spectrale de l'échantillon UP₆ obtenu à la fin de la cristallisation des phosphates calciques en présence de l'extrait de pomme à la concentration C= 40g/L confirme la précipitation des phosphates sous forme de carbonate apatite (carbapatite).

Le spectre IR est typique du phosphate de calcium carbonaté (carbapatite) dont les vibrations caractéristiques sont à 1415.3 cm⁻¹ (vibration des ions carbonates CO₃⁻²), à 1018.5 cm⁻¹ asymétrique à gauche (vibration de valence des ions phosphates PO₄⁻³). La brushite est identifiée (des bandes clés) à l'état de traces.

V.2.2.3 Discussion :

L'ajout des extraits aqueux de *Malus pumila* dans l'intervalle de concentration choisi a été en faveur de la formation de la carbapatite. En effet, selon les conditions de sursaturation et de pH, la présence des phosphates de calcium apatitiques pourrait résulter de la nucléation homogène de phosphates de calcium métastables se transformant ultérieurement en apatite (**Heughebaert, 1984**).

La brushite est une espèce phosphatique, elle s'observe en urine modérément acide dans des contextes d'hypercalciurie avec hyperphosphaturie et hypocitratutrie.

De nombreux travaux montrent que la brushite est capable de se convertir, elle aussi, en apatite après une conversion intermédiaire en phosphate octocalcique (**Heughebaert, 1984 ; Pak, 1981 ; Bahri, 2005**). La diminution de la sursaturation phosphocalcique du milieu par diminution de la calciurie et de la phosphaturie est un autre facteur qui pourrait intervenir dans la conversion de la brushite (**Cheng, 1988**).

Dans les conditions expérimentales de nos essais, le pH du milieu de cristallisation des phosphates calciques n'a pratiquement pas varié, dans le même essai. Cependant, d'un essai à un autre, nous remarquons que le pH diminuait en fonction de la concentration de *Malus Pumila*. Il passe à 6.57 en présence de l'extrait de *Malus* à 40g/L. Dans tous les essais en présence de *Malus pumila*, nous avons observé une conversion de la brushite en carbapatite, malgré l'évolution du pH vers l'acidité et qui devrait être en

faveur de la cristallisation de la brushite. Nous notons, qu'à pH 6.7, le milieu était favorable à la précipitation de la brushite, mais en absence de *Malus pumila*.

Dans ces conditions, et en présence de *Malus Pumila*, l'action de la plante semble être élevée et le pH ne semble pas être le facteur dominant qui influence la cristallisation des phosphates. A la lumière de ces observations, il en ressort que l'extrait de *Malus pumila* inhibe fortement la cristallisation de la brushite mais à l'inverse elle induit très fortement la cristallisation de la carbapatite.

V.2.3 Etude de l'effet des extraits aqueux d'*Hordeum-vulgare* (l'orge) sur la cristallisation de la brushite

V.2.3.1 Cristallisation de la brushite, en absence des extraits aqueux d'orge (*Hordeum -vulgare*)

La cristallisation de la brushite est testée dans le modèle biologique qu'est l'urine totale à 37°C. L'urine totale utilisée dans les essais en présence de *Malus pumila*, a été aussi utilisée pour les essais en présence d'*Hordeum vulgare*. Par conséquent, l'échantillon de référence est le même pour les deux plantes.

V.2.3.2 Cristallisation de la brushite, en présence des extraits aqueux d'orge (*Hordeum -vulgare*)

■ V.2.3.2.1 Echantillon UO₁ : en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à la concentration (C₁= 0,0625g/L)

La cristallisation de la brushite a été induite en milieu urinaire, selon le même protocole précédent. Les valeurs du pH mesuré, sont résumées dans le tableau V.14

Tableau V.14 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extraits de plante à la concentration 0,0625g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,79	6,73

V.2.3.2.1.a Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à 0,0625g/L, la micrographie MEB (50×) illustrée dans la figure V.35, montre une très forte cristallisation de phosphates calciques sous forme de granulations en amas, très condensées.

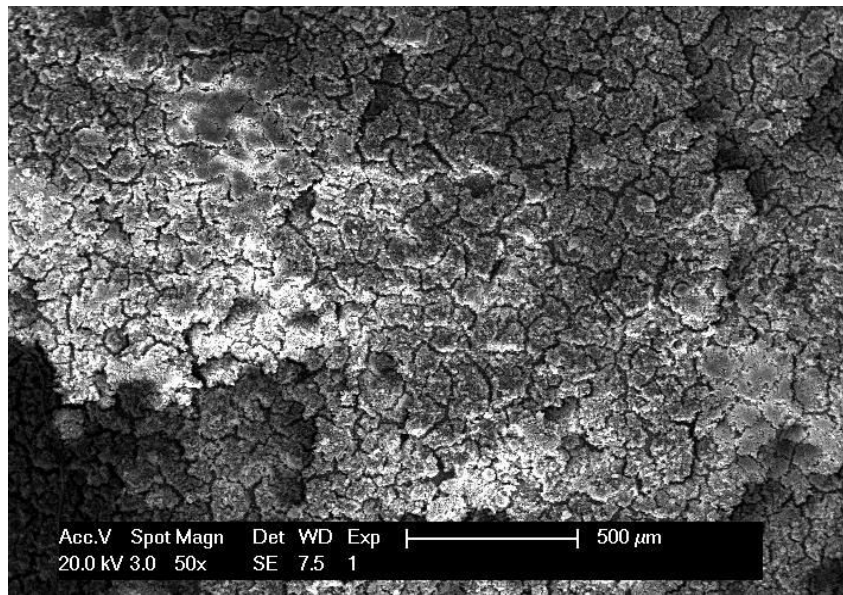


Figure V.35 Micrographie MEB (50x) de l'échantillon UO₁ (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à 0,0625g/L) (vue globale)

Une autre micrographie MEB (1200x), montre des granulations sphériques blanchâtres de taille maximale de 42,7µm (figure V. 36(a)). Après un minutieux balayage MEB, il apparaît quelques rares cristaux de brushite sous forme de baguettes agrégées (voir figure V.36(b) dont la taille ne dépasse pas 55µm.

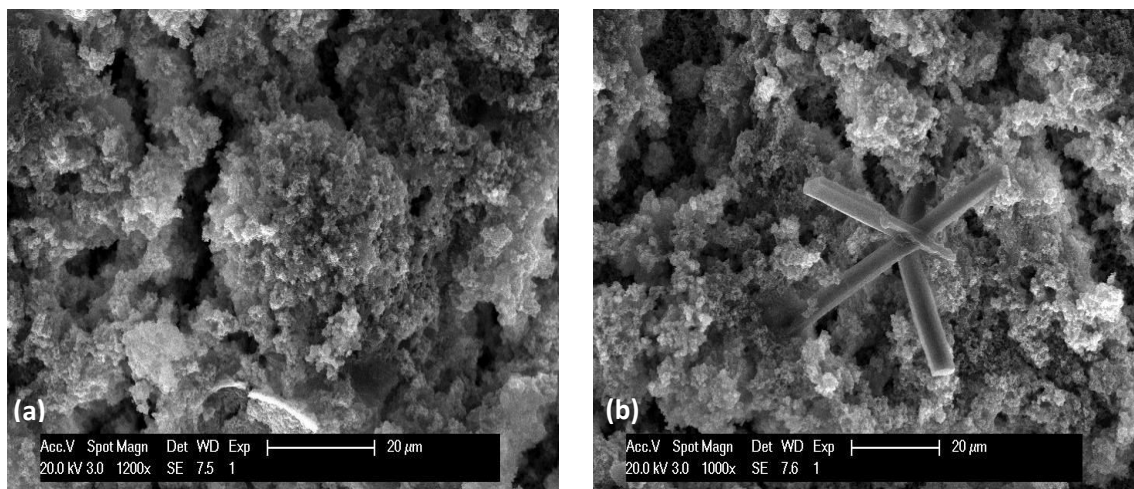


Figure V.36 Micrographies MEB de l'échantillon UO₁ (en présence d'extrait d'orge à 0,0625g/L), à différents agrandissements. (a) : granulations sphériques d'apatite ; (b) : cristaux de brushite et des granulations d'apatite

D'après ces observations, l'échantillon UO1 est formé majoritairement d'apatite associée à quelques traces de brushite.

V.2.3.2.1 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

L'échantillon obtenu après filtration de la solution, en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum vulgare* a été caractérisé par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF). Il apparaît alors, que le composé majoritaire est la carbapatite (bande asymétrique des phosphates à $1014,38\text{ cm}^{-1}$, des bandes de valence des carbonates à $1418,05\text{ cm}^{-1}$. L'épaulement au voisinage de 1060 cm^{-1} et les bandes à 1600 et $552,82\text{ cm}^{-1}$ sont attribuées à la présence de la brushite en traces.

Figure V.37: Spectre IR de l'échantillon UO_1

■ V.2.3.2.2. Echantillon UO_2 : en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à la concentration ($C_2= 0,125\text{g/L}$)

Les différents pH du milieu de cristallisation pour l'échantillon UO_2 testé à 37°C sont illustrés dans le tableau V.15

Tableau V.15 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de la plante à la concentration $0,125\text{g/L}$.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,84	6,78

Le pH de cristallisation des phosphates calciques dans cet échantillon est plus élevé que celui déterminé en présence de l'extrait aqueux à 0.625g/L .

V.2.3.2.2.a Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence d'extrait aqueux d'orge à la concentration $C_2 = 0,125\text{g/L}$, les cristaux observés à un agrandissement de 49x (voir figure V.38) paraissent de la même espèce que ceux observés dans l'échantillon précédent, avec une abondance moins importante.

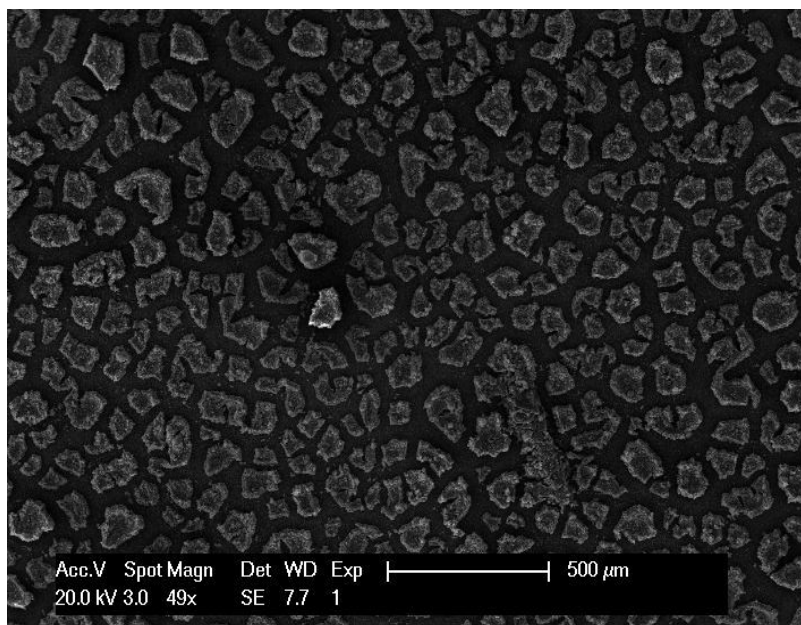


Figure V.38 Micrographie MEB (49x) de l'échantillon UO_2 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à $0,125\text{g/L}$) (vue globale)

Les micrographies illustrées dans la figure V.39, révèlent d'une part, des granulations sphériques d'apatite de taille de $60\mu\text{m}$ (voir figure V.39(a)) et d'autre part, des cristaux de brushite de taille maximale de $17,14\mu\text{m}$ (voir figure V.39(b)).

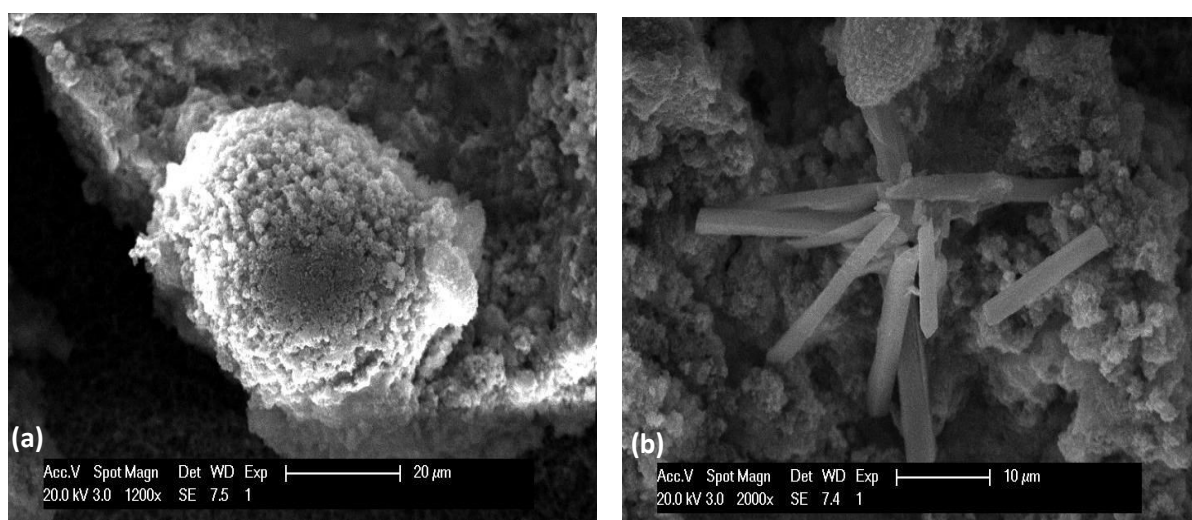


Figure V.39 Micrographies MEB de l'échantillon UO_2 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à $0,125\text{g/L}$), à différents agrandissements. (a) : granulations sphériques d'apatite ; (b) : cristaux de brushite en forme de baguette et des granulations sphériques d'apatite.

■ V.2.3.2.3. Echantillon UO_3 : en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à la concentration ($C_3= 0,25g/L$)

Les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UO_3 testé à $37^{\circ}C$ sont illustrés dans le tableau V.16

Tableau V.16 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration $0,25g/L$

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à $37^{\circ}C$)	6,54	6,78	6,77

V.2.3.2.3.a Analyse par microscopie électronique à balayage

La figure V.40 illustre la micrographie d'une vue globale (agrandissement à 50x) de l'échantillon UO_3 . Il apparaît alors qu'en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à $0,25g/L$, une forte cristallisation hétérogène de phosphates calciques sous forme de granulations sphériques d'apatite plus éparses que les précédentes et des cristaux de brushite, est observée.

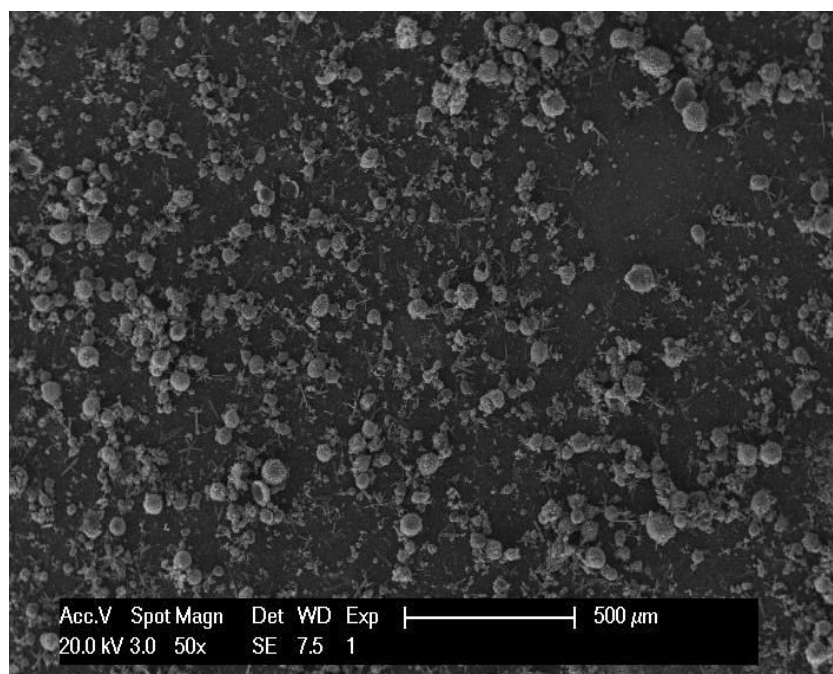


Figure V.40 Micrographie MEB (50x) de l'échantillon UO_3 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à $0,25g/L$) (vue globale)

Examinés de plus près, les granulations sphériques ressemblent en fait à des « cocons » (voir figure V.41 (a)), où se logent d'autres sphérules d'apatite. Ces

dernières sont entourées d'un cortex formé par un amas d'innombrables petites sphérules faisant apparaître, quelques fois, des formes en aiguilles faisant rappeler la forme de cristallisation de la brushite.

Le précipité obtenu après ajout de 0.25g/L d'orge, est formé de cristaux asymétriques de brushite agrégés radialement d'aspect en oursin en nucléation hétérogène avec des granulations éparses d'apatite (voir figure V.41(b)). L'agrandissement 2000 fois de l'image MEB montre la présence de granulations éparses d'apatite en cristallisation hétérogène sur des cristaux de brushite agrégés radialement (voir figure V.41(c)).

Une autre observation qu'illustre la figure V.41(d) est la présence de cristaux d'oxalate de calcium dihydraté (wedellite) sous forme d'enveloppe agrégés aux cristaux de brushite maclés, de taille de 66,66 μm .

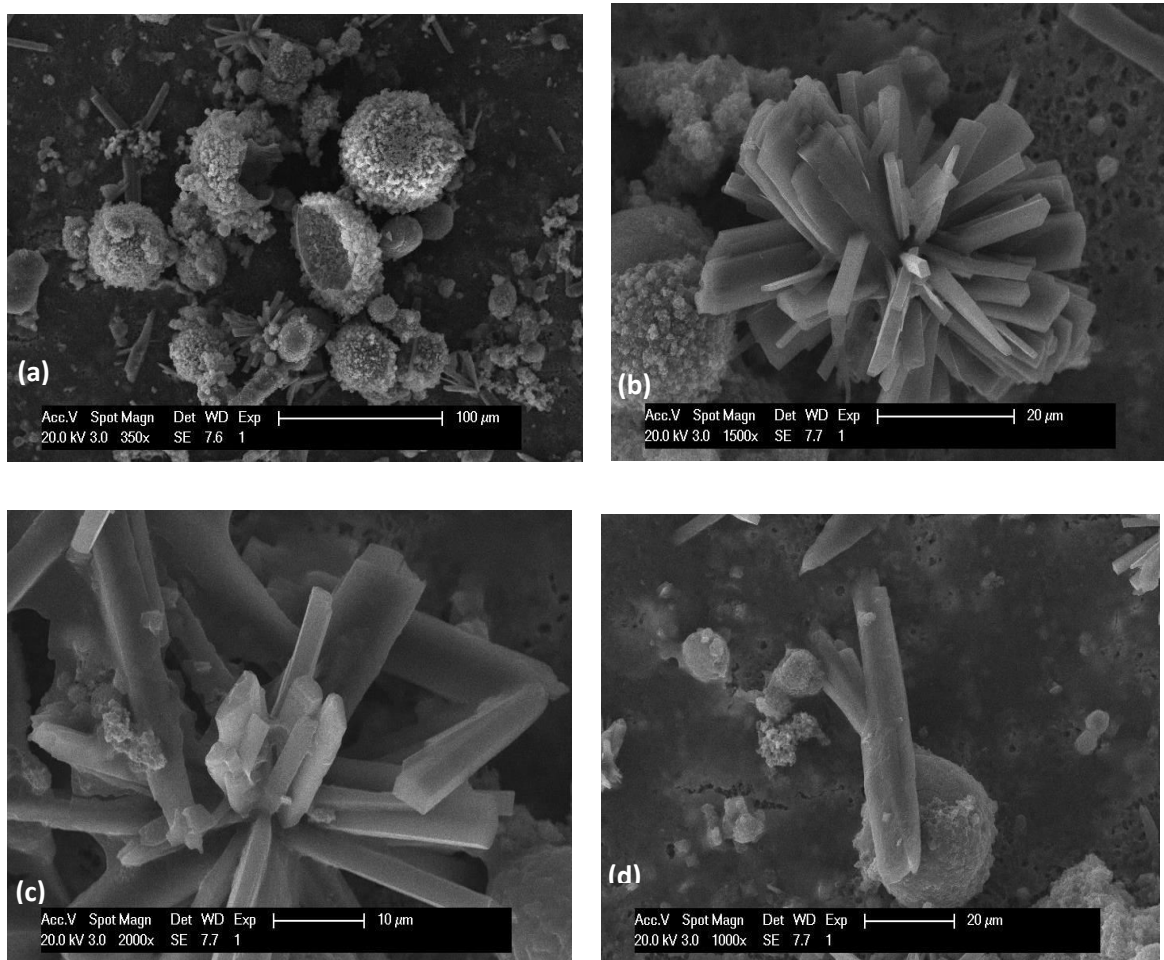


Figure V. 41 Micrographie MEB de l'échantillon UO_3 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à 0,25g/L), à différents agrandissements. (a) : des cristaux de brushite et des granulations d'apatite ; (b) : agrégat de cristaux de brushite d'aspect en oursin ; (c): cristallisation hétérogène d'apatite sur des cristaux de brushite agrégés ; (d) : cristaux de brushite agrégés et des cristaux d'oxalate de calcium en forme d'enveloppe.

■ **V.2.3.2.4. Echantillon UO_4 : en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à la concentration ($C_4= 0,5g/L$)**

Le pH du milieu de précipitation des phosphates en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* (tableau V.17) a nettement augmenté.

Tableau V.17 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 0,5g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,69	6,72

V.2.3.2.4.a Analyse par microscopie électronique à balayage

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB de l'échantillon obtenu en présence de l'extrait d'orge à la concentration 0,5g/L, montre une forte cristallisation des phosphates calciques sous forme de granulations en amas. Cette cristallisation paraît être similaire à celle qui a été observée dans l'échantillon 1 (en présence d'extrait à 0.0625g/L).

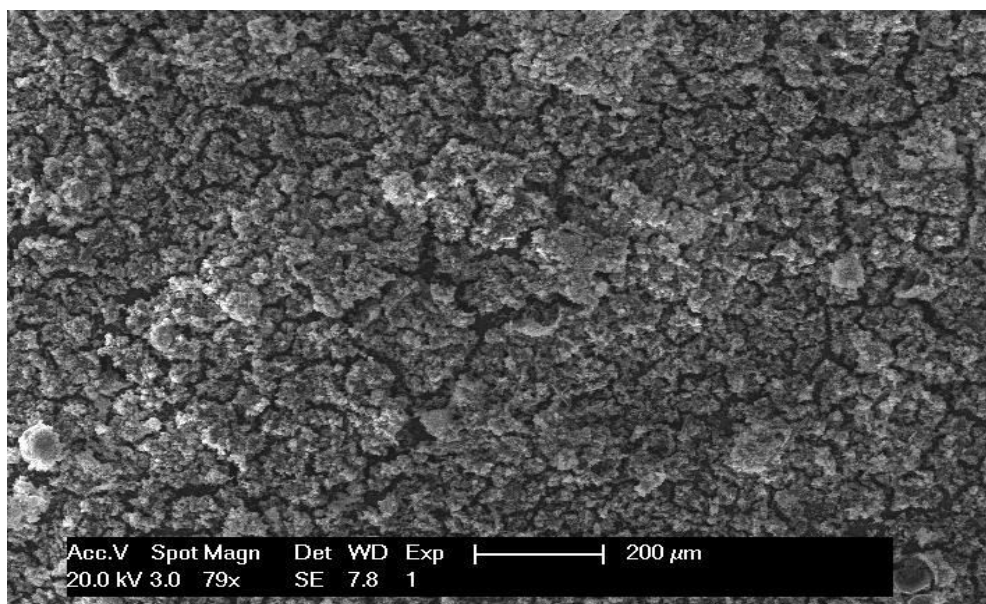


Figure V. 42 Micrographie MEB (79×) de l'échantillon UO_4 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à 0,5g/L) (vue globale)

Après balayage de l'échantillon par MEB, l'agrandissement de l'image à 2500×, nous révèle une cristallisation de granulation d'apatite en forme de sphérules ((voir figure V.43(a)) et une cristallisation hétérogène de granulations blanchâtres d'apatite sur des cristaux de brushite agrégés radialement (voir figure V.43(b)), sur des cristaux de brushite en baguette (voir figure V.43(c)) ou d'aspect en oursin (voir figure V.43(d))

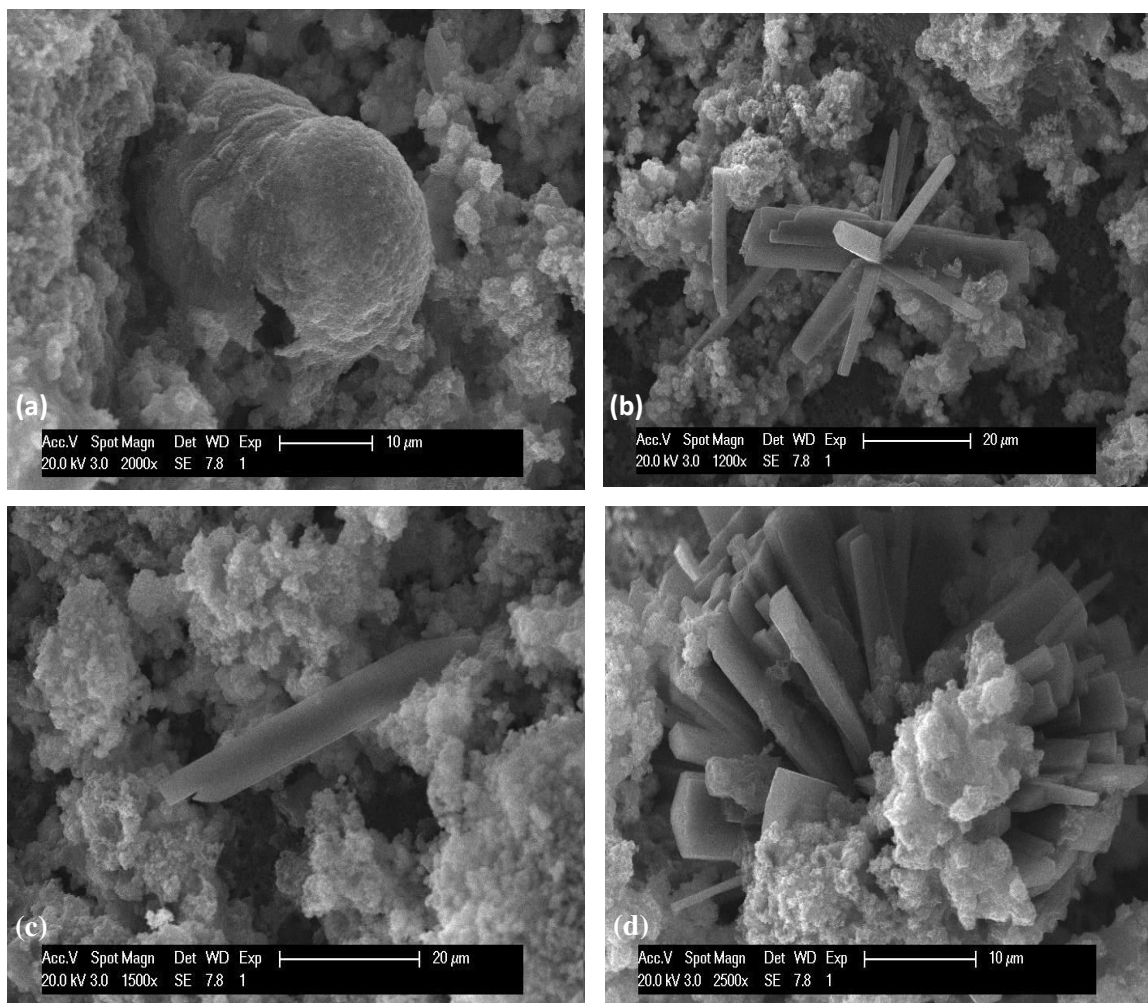


Figure V.43 Micrographie MEB de l'échantillon UO_4 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à 0,5g/L), à différents agrandissements. (a): agrégats de granulations sphériques d'apatite ; (b) : agrégats de cristaux maclés de brushite ; (c) : cristal de brushite en forme de baguette ; (d) : cristallisation hétérogène de granulations d'apatite sur un agrégat de brushite

V.2.3.2.4 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

La cristallisation de la brushite en milieu urinaire s'est accompagnée par la formation des granulations sphériques identifiées par MEB comme étant des apatites. Afin de caractériser et identifier ces granulations, nous avons procédé à la caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier de l'échantillon recueilli à la fin de test.

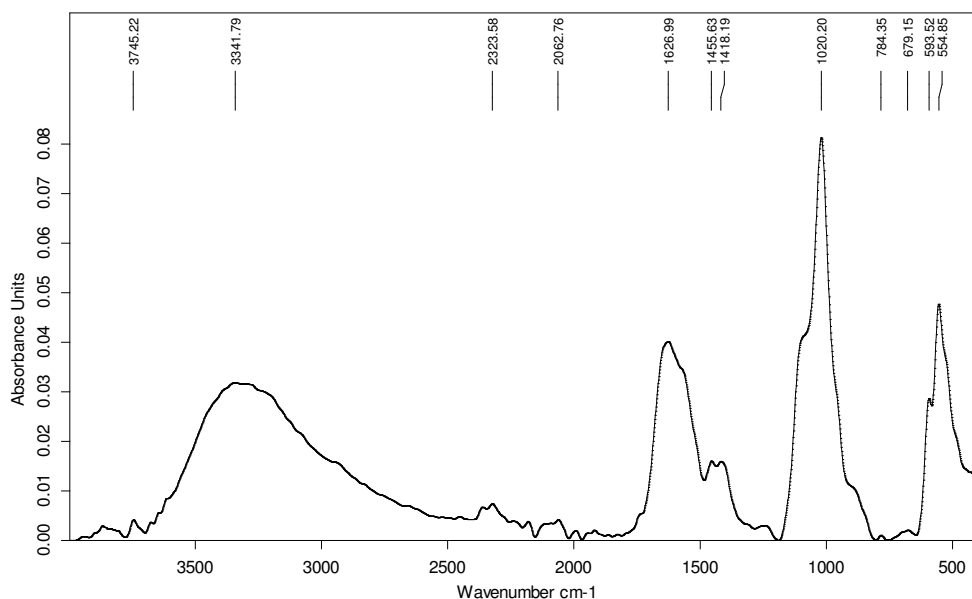


Figure V.44: Spectre IR de l'échantillon UO₄
C:\Program Files\OPUS_65\MEAS\U Q6.0 U Q6 Instrument type and / or accessory 18/12/2013
Seite 1 von 1

A première vue, nous observons les bandes attribuées aux vibrations des phosphates entre 1000-1160 cm⁻¹. En effet, l'épaule à 1060 cm⁻¹ est caractéristique de la brushite présente comme constituant secondaire dans un mélange où la carapatite (phosphates de calcium carbonaté) est prédominante. Le spectre IR montre aussi la bande clé de carapatite (bande asymétrique à 1020,20 cm⁻¹ épaulée à 1100 cm⁻¹) et des bandes de carbonates à 1455,63 et 1418,19 cm⁻¹. Par conséquent, le précipité formé est majoritairement formé de carapatite.

■ V.2.3.2.5. Echantillon UO₅: en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à la concentration (C₅= 1g/L)

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UO₅ testé à 37⁰C

Tableau V.18 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 1g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,73	6,70

V.2.3.2.5.a Analyse par microscopie électronique à balayage

La cristallisation des phosphates calciques, en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à la concentration 1g/L, montre la présence des granulations sphériques d'apatites associées à quelques cristaux de brushite (voir figure V.45). L'agrégation de cristaux paraît être moins importante que celle de l'échantillon précédent.

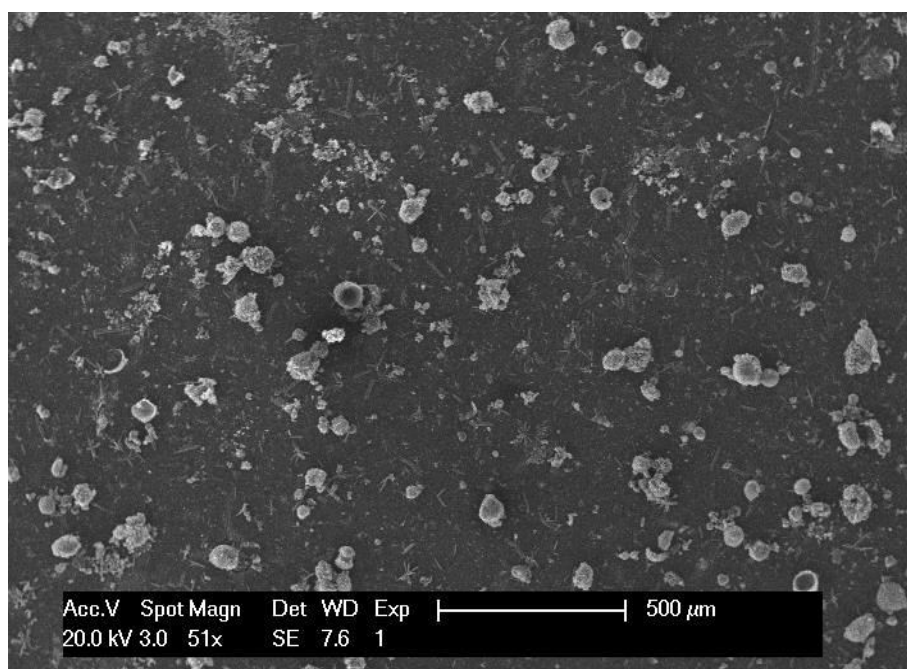


Figure V.45 Micrographie MEB (51x) de l'échantillon UO₅ (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à la concentration 1g/L) (vue globale)

De plus, examinés de plus près (650x), cet échantillon présente de petits cristaux asymétriques de brushite agrégés et maclés ainsi que des granulations sphériques d'apatite. Il apparaît aussi un amas d'innombrables petites sphérules faisant apparaître la forme d'un cortex vide (voir figure V.46(a)).

L'agrandissement à 1200×, montre un agrégat de cristaux de brushite de taille de 76µm et quelques cristaux d'oxalate de calcium sous forme d'enveloppe (voir figure V.46(b)). Un agrégat de brushite d'aspect en oursin formé par des cristaux de brushite en forme de baguette et en forme de gerbe est observé par un agrandissement de l'image MEB à (1000×). Cet agrégat de taille de 63,33µm représenté dans la figure V.46(c) est accompagné d'autres cristaux de brushite en forme de crayons).

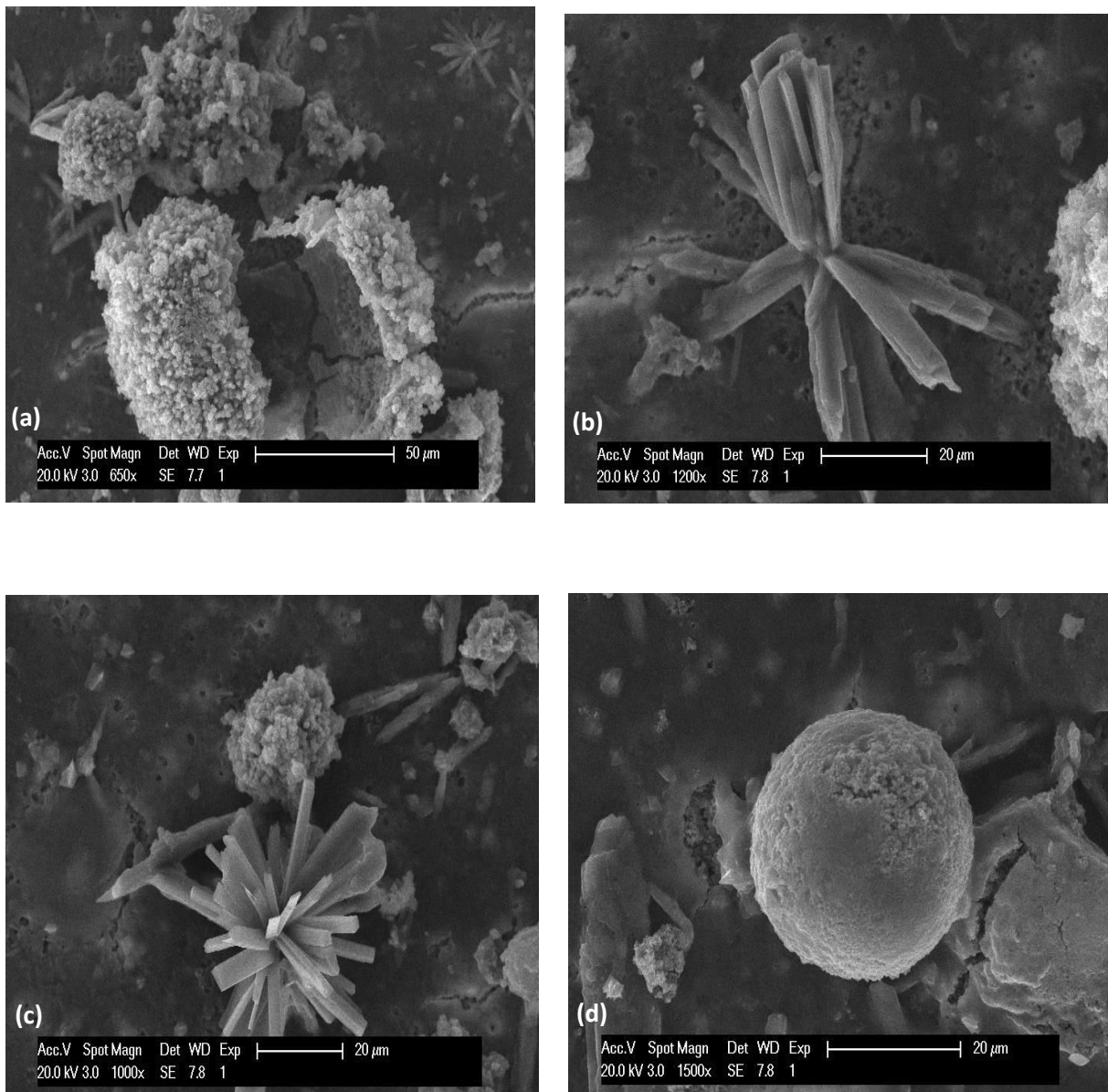


Figure V.46 Micrographie MEB de l'échantillon UO₅ (en présence d'extrait d'Hordeum-vulgare à 1g/L), à différents agrandissements. (a): agrégat de granulations sphériques d'apatite et des cristaux de brushite agrégés ; (b): agrégat des cristaux de brushite maclés et quelques cristaux d'oxalate de calcium ; (c): agrégat de brushite d'aspect en oursin, des cristaux de brushite en forme de crayon et de baguette; (d): granulations sphériques d'apatite, des cristaux de brushite et des cristaux d'oxalate de calcium agrégés

Nous notons aussi dans le précipité UO5, la présence des granulations sphériques blanchâtres d'apatite de taille maximale de 33,68 μ m, des petits cristaux d'oxalate de calcium sous forme d'enveloppe ainsi que leurs agrégats, illustrés dans la figure V.46(d).

Un autre faciès de la brushite est observé dans cet échantillon, il s'agit de la forme en croix de taille de 50 μ m (voir figure V.47). Des granulations d'apatite et des cristaux d'oxalate de calcium dihydraté sont associées à cette macle de brushite.

Globalement la cristallisation de la brushite et de la wedellite a lieu, chez un lithiasique, dans un contexte d'hypercalciurie. En effet, la brushite, rare chez les sujets non lithiasiques, est considérée, en urine hypercalciurique, comme précurseur de calcul calcique et de la minéralisation osseuse, et notamment des apatites biologiques.

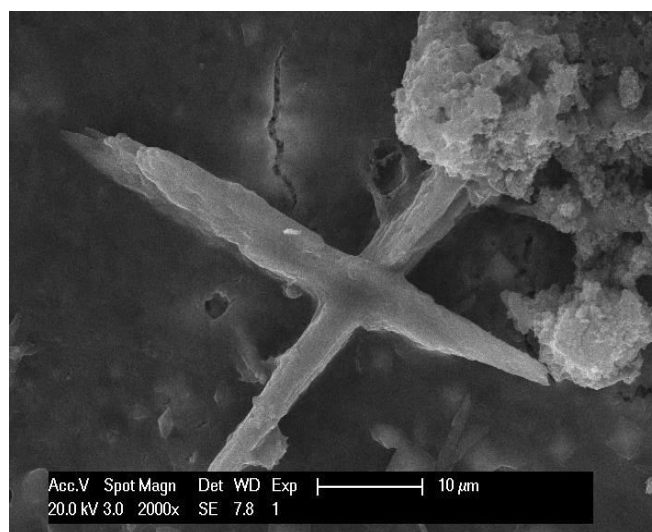


Figure V.47: Micrographie MEB 2000 \times de l'échantillon UO₅ (une macle de brushite en forme de croix en cristallisation hétérogène avec des cristaux d'oxalate de calcium dihydraté en forme d'enveloppe et de l'apatite)

■ V.2.3.2.6. Echantillon UO₆ : en présence d'extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare* à la concentration (C₆= 40g/L)

La réaction de formation de phosphates calciques dans l'urine totale, en présence d'un extrait aqueux concentré d'*Hordeum vulgare* se fait sans variation significative de pH.

Les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UO_6 à $37^{\circ}C$ sont illustrés dans le tableau V.19.

Tableau V.19 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 40g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à $37^{\circ}C$)	6,54	6,76	6,73

V.2.3.2.6.a Analyse par microscopie électronique à balayage

A plus forte concentration (40g/L) en extrait aqueux d'*Hordeum-vulgare*, une faible cristallisation de phosphates calciques sous forme de cristaux de brushite et de granulations sphériques d'apatite est observée, comme le montre l'image prise par MEB (80×), illustré dans la figure V.48.

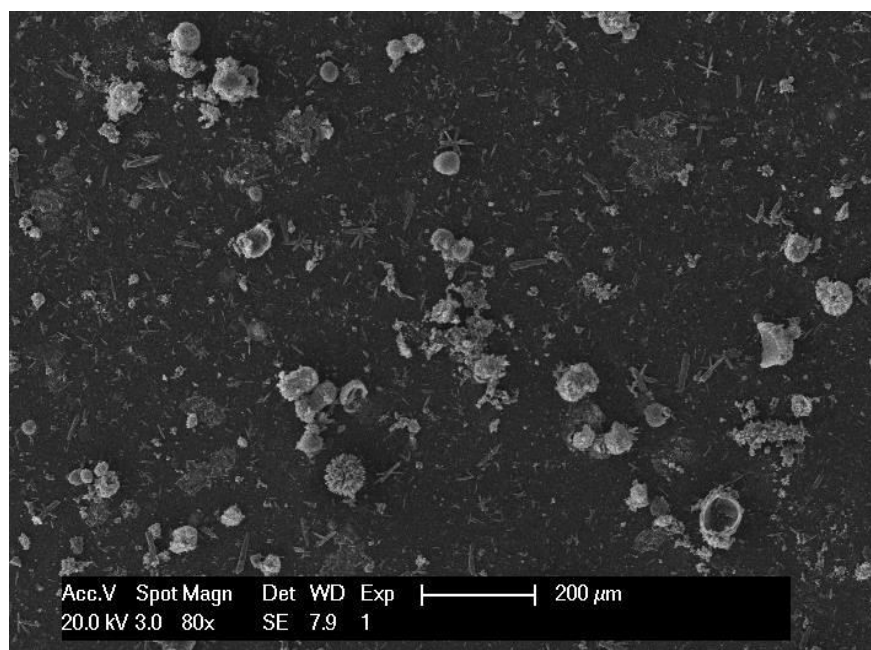


Figure V.48 Micrographie MEB (80×) de l'échantillon UO_6 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à 40 g/L) (vue globale)

L'agrandissement à 650 fois de l'image MEB montre la présence des granulations sphériques d'apatite de taille maximale de $120\mu\text{m}$ qui sont entourées d'un cortex formé par un amas d'innombrables petites sphérules, des cristaux et des agrégats de brushite (voir figure V.49(a)).

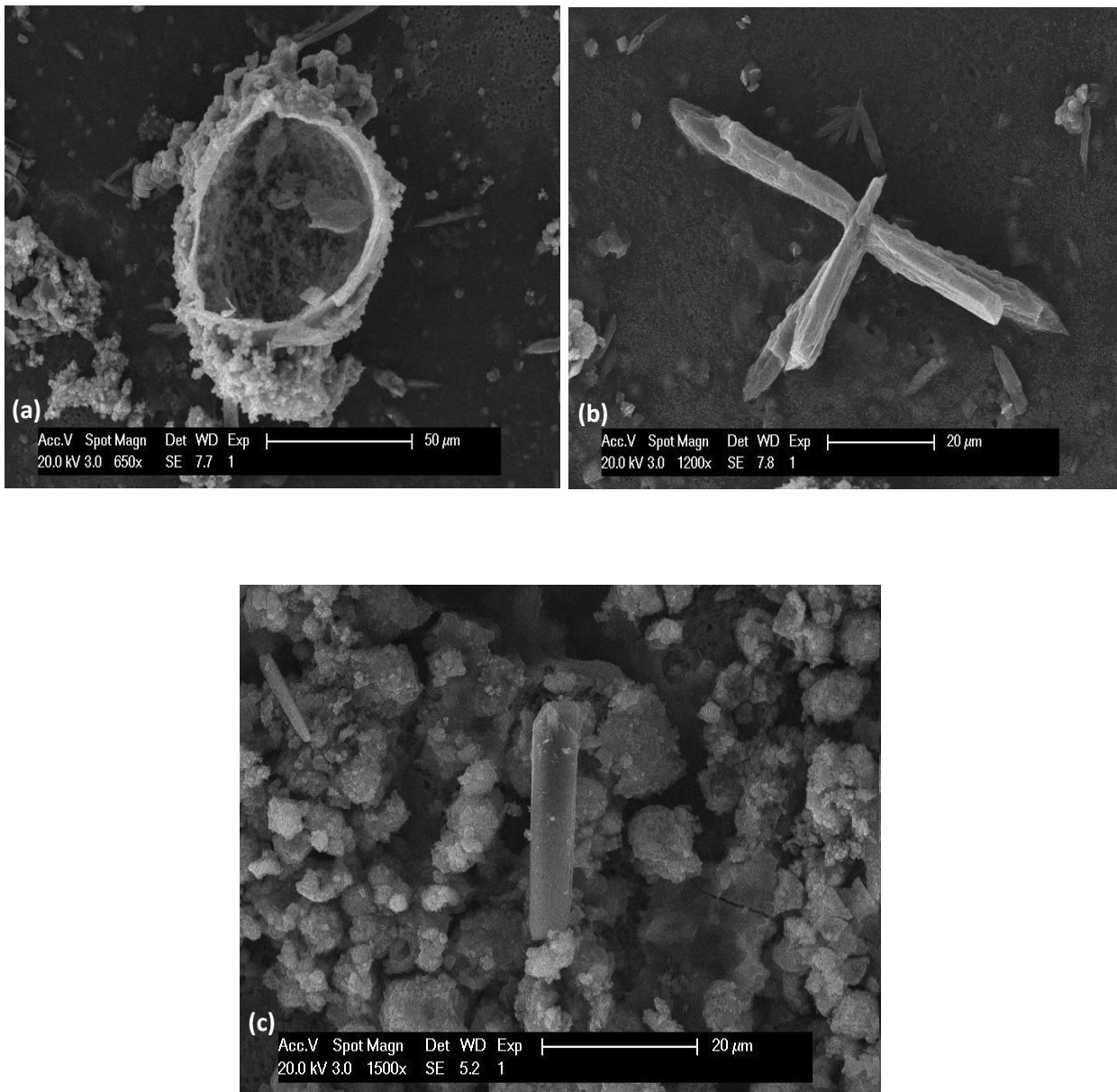


Figure V.49 Micrographie MEB de l'échantillon UO_6 (en présence d'extrait d'*Hordeum-vulgare* à 40g/L), à différents agrandissement. (a): cortex d'une granulation sphérique d'apatite et des cristaux de brushite ; (b): agrégats de brushite en présence de plusieurs cristaux d'oxalate de calcium ; (c): innombrable granulations sphériques d'apatite et quelque cristaux de brushite en forme de baguette.

Une autre observation importante est la présence d'un volumineux agrégat de brushite en forme de croix de taille de 85,33 μm , en cristallisation hétérogène avec des cristaux d'oxalate de calcium dihydraté (wedellite). Nous avons observé aussi la présence de plusieurs agrégats d'oxalate de calcium en forme d'enveloppe et d'autres agrégats de brushite (voir figure V.49(b)).

Alors qu'à plus fort agrandissement de l'image à 1500fois, nous observons une abondance de granulations d'apatite et quelques cristaux asymétriques de brushite de taille moyenne de 21,5 μm (voir figure V.49(c)).

Discussion :

Dans notre approche expérimentale, le pH du milieu de cristallisation des phosphates calciques, en présence des extraits d'*Hordeum vulgare*, était >6.7 avec la valeur maximale mesurée de 6.84, alors qu'en absence de la plante le pH du milieu de cristallisation des phosphates était de 6.7. Dans ce dernier milieu, nous avons observé une abondante cristallisation de brushite, alors que dans les premiers c'est la carbapatite qui prédominait le milieu urinaire. Cette observation est en accord avec les travaux qui rapportent que la brushite se forme spontanément dans les urines relativement plus acides que les autres phosphates, alors que celui des autres phosphates est proche de 7. Par conséquent, dans les conditions expérimentales de la présente étude, le pH du milieu semble être un facteur qui domine et donc influence la cristallisation des formes de phosphates, ce qui confirme les observations des travaux antérieurs ((**Pak, 1969 ; Boistelle et Berland, 1992 ; Ferreira et al, 2003 ; Daudon et al, 2004 ; Bahri, 2005 ; Sujata et al, 2010,; Daudon et al, 2012**)).

Une autre observation très intéressante est que les extraits aqueux d'*Hordeum vulgare* alcalinisent le milieu urinaire, et c'est ce qui a favorisé la conversion de la brushite en carbapatite. Il en ressort que *Hordeum vulgare* inhibe fortement la cristallisation de la brushite, dans tout l'intervalle de concentration des extraits aqueux de la plante mais à l'inverse elle induit la précipitation de la carbapatite. Toutefois, ce pouvoir inducteur

diminue lorsque la concentration de la plante augmente. Dans ce dernier cas, nous avons pu déceler que la taille des rares agrégats de brushite formés dans ce milieu, était la plus élevée des tailles mesurées dans tous les essais (un agrégat de 85 um). Ceci témoigne qu'à concentration très élevée, la plante *Hordeum vulgare* peut induire l'agrégation cristalline de la brushite. Si de plus le milieu est hypercalciurique, cela augmenterait le risque lithogène lié à la présence de la brushite (**Daudon et al, 2000**)

Une autre observation détectée uniquement par MEB, est la présence de cristaux d'oxalate de calcium dihydraté (wedellite) sous forme d'enveloppe agrégés aux cristaux de brushite maclés. Cette observation confirme celles des travaux de (**Djaroud et al, 2013**) où il est rapporté qu'*Hordeum vulgare* est inducteur de la cristallisation de l'oxalate de calcium dihydraté (wedellite) dans des urines de sujets sains, puisque sa présence à concentration élevée a eu pour effet l'augmentation de la taille et du nombre de cristaux.

Dans ce contexte, et à la lumière de nos observations, *Hordeum vulgare*, ne devrait pas être préconisée dans le traitement prophylactique de la lithiase calcique puisqu'aux fortes concentrations, elle favorise l'agrégation de la brushite et de la wedellite et par conséquent l'augmentation du risque lithogène. Toutefois, ces observations devront être confirmées par des études, in vivo.

V.2.4 Etude de l'effet des racines de *Rubia tinctorum* L (la garance)

V.2.4.1 Cristallisation de la brushite dans l'urine, en absence des extraits aqueux de garance (*Rubia tinctorum*)

La cristallisation de la brushite dans l'urine a été réalisée pour les mêmes échantillons d'urine que ceux de *Malus pumila*. Par conséquent, l'échantillon de référence (sans inhibiteur) est le même que celui décrit dans l'étude de *Malus pumila*.

V.2.4.2 Cristallisation de la brushite, en présence des extraits aqueux des racines de garance (*Rubia tinctorum* L)

■ V.2.4.2.1 Echantillon UF₁ : en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration (C₁= 0,0625g/L)

Les valeurs du pH mesuré du milieu de cristallisation à 37 C⁰, sont résumées dans le tableau V.20

Tableau V.20 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 0,0625g/L.

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,51	6,49

V.2.4.2.1.a Analyse par microscopie électronique à balayage

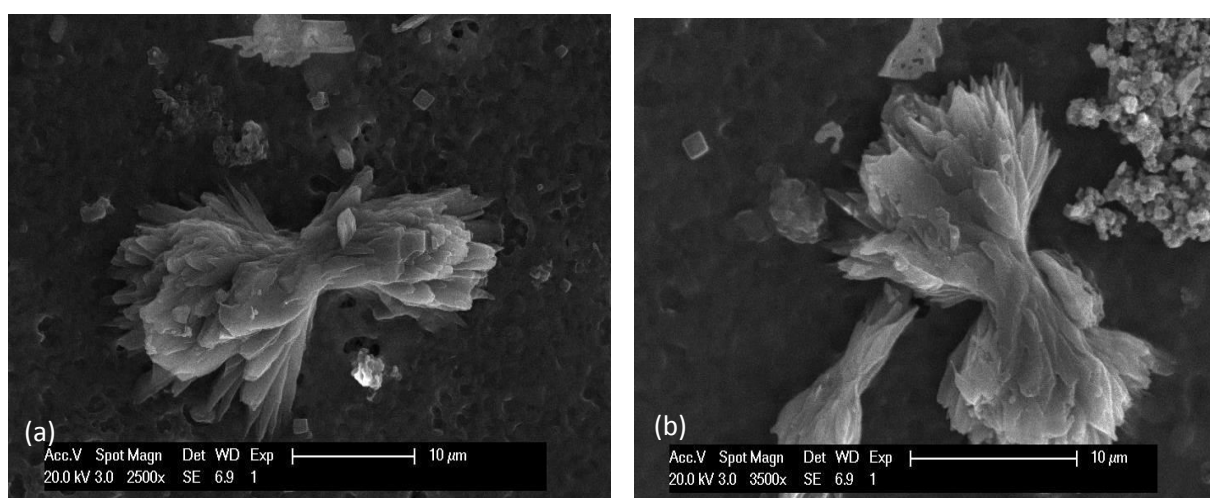


Figure V.50 Micrographie MEB de l'échantillon UF₁ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 0,0625g/L). (a) : agrandissement à 2500x ; (b) : agrandissement à 3500x

L'observation en microscopie électronique à balayage (MEB) des cristaux retenus dans le filtre de cet échantillon, illustré dans la figure V.38(a) a révélé la présence de phosphate acide de calcium dihydraté (brushite) agrégé en gerbe de taille de 31,25 μm et de nombreux petits cristaux d'oxalate de calcium sous forme d'enveloppe (weddellite) de taille moyenne de 1,37 μm .

L'agrandissement à 3500 fois de l'image MEB, révèle d'une part, des agrégats de cristaux de brushite en forme de gerbe de dimension maximale de 23.63 μm et un cristal d'oxalate de calcium en forme d'enveloppe (weddellite) de taille de 1,81 μm et d'autre part, cette observation montre aussi la présence d'innombrables granulations sphériques blanchâtres d'apatite en amas (voir figure V.38 (b)).

■ V.2.4.2.2- Echantillon UF₂ : en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration (C₂= 0,125g/L)

Le pH à 37 C⁰ de la solution en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration C₂= 0,125 g/L reste pratiquement constant durant la réaction.

Tableau V.21 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 0,125g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,56	6,54

I V.2.4.2.2.a Analyse par microscopie électronique à balayage

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB de l'échantillon obtenu en présence de l'extrait aqueux de racine de garance à la concentration 0,125 g/L, montre la présence d'innombrables petits cristaux de brushite en forme de baguette et en forme d'aiguilles ainsi que, des cristaux asymétriques de brushite agrégés radialement en gerbe. Nous notons aussi la présence des granulations sphériques blanchâtres d'apatite (voir figure V.51).

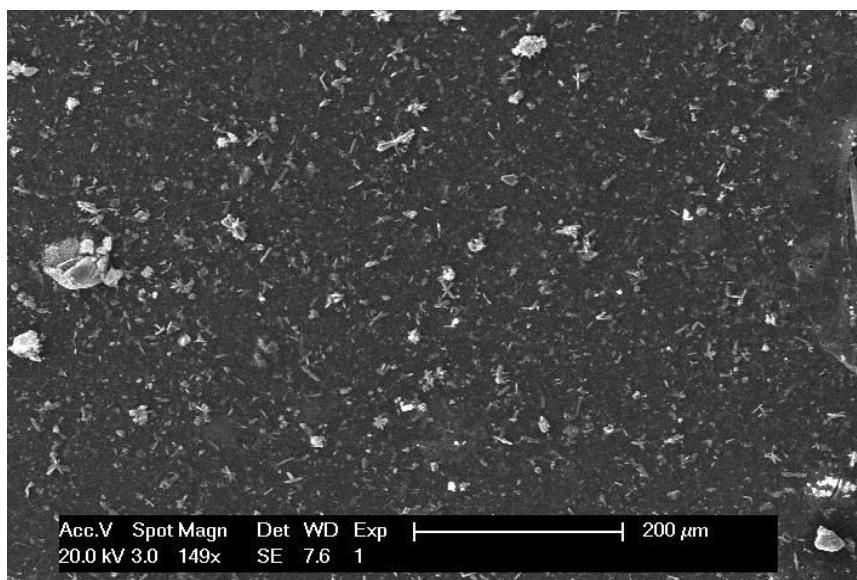


Figure V.51 Micrographie MEB (149x) de l'échantillon UF₂ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 0,125g/L) (vue globale)

Vu de plus près, cet échantillon présente d'innombrables granulations sphériques d'apatite de taille maximale de 95,23 µm, associés à plusieurs petits cristaux de brushite agrégés en forme de baguette et en forme de gerbe (voir figure V.52(a)). L'agrandissement de la micrographie MEB de cet échantillon à 3500fois montre la présence des cristaux de brushite agrégés radialement d'aspect en oursin de taille maximale de 23,52 µm associés à des granulations sphériques d'apatite. En plus, cette observation montre la présence de cristaux d'oxalate de calcium dihydraté en forme d'enveloppe de taille maximale de 1,76 µm (voir figure V.52(b)).

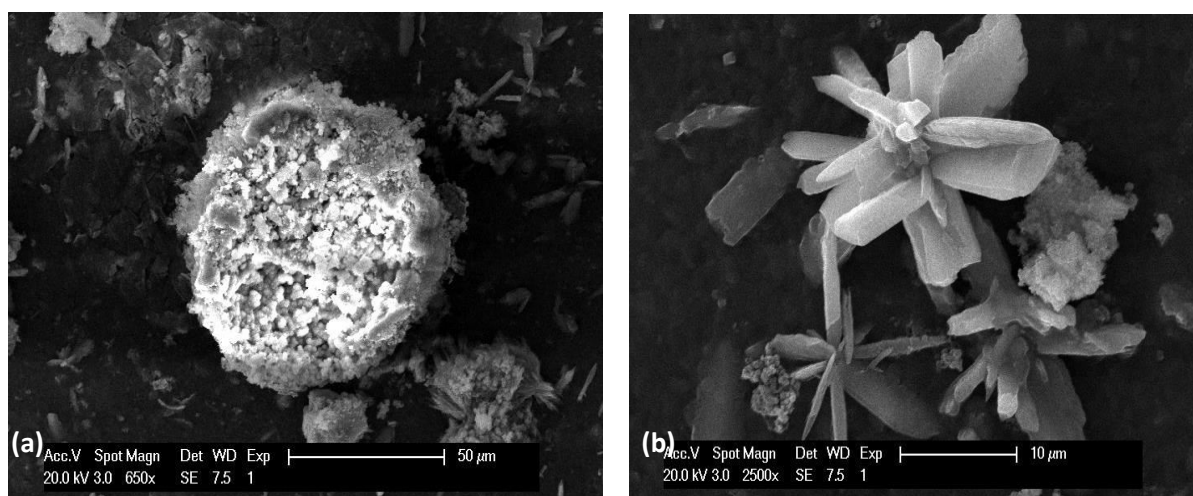


Figure V.52 Micrographie MEB de l'échantillon UF₂ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 0,125g/L) à différents agrandissements. (a) : granulations sphériques d'apatite ; (b) : cristaux de brushite agrégés d'aspect en oursin

I V.2.4.2.2.b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

L'analyse spectrale de l'échantillon UF₂ obtenu à la fin de la cristallisation des phosphates calciques en présence de l'extrait de *Rubia tinctorum* à la concentration C= 0,125g/L confirme la précipitation des phosphates sous forme de carbonate apatite (carbapatite).

En effet, la bande asymétrique à 1020,2 cm⁻¹, épaulée à 1150 cm⁻¹ est attribuée à la valence des phosphates de la carbapatite. On note aussi la bande de valence de carbonates à 1409,25 cm⁻¹. L'hydrogénophosphate de calcium dihydraté (brushite) est présent à l'état de traces. Cependant, un épaulement au voisinage de 1100 cm⁻¹ et des bandes à 1589,25 et 555,71 cm⁻¹ sont attribuées à la brushite.

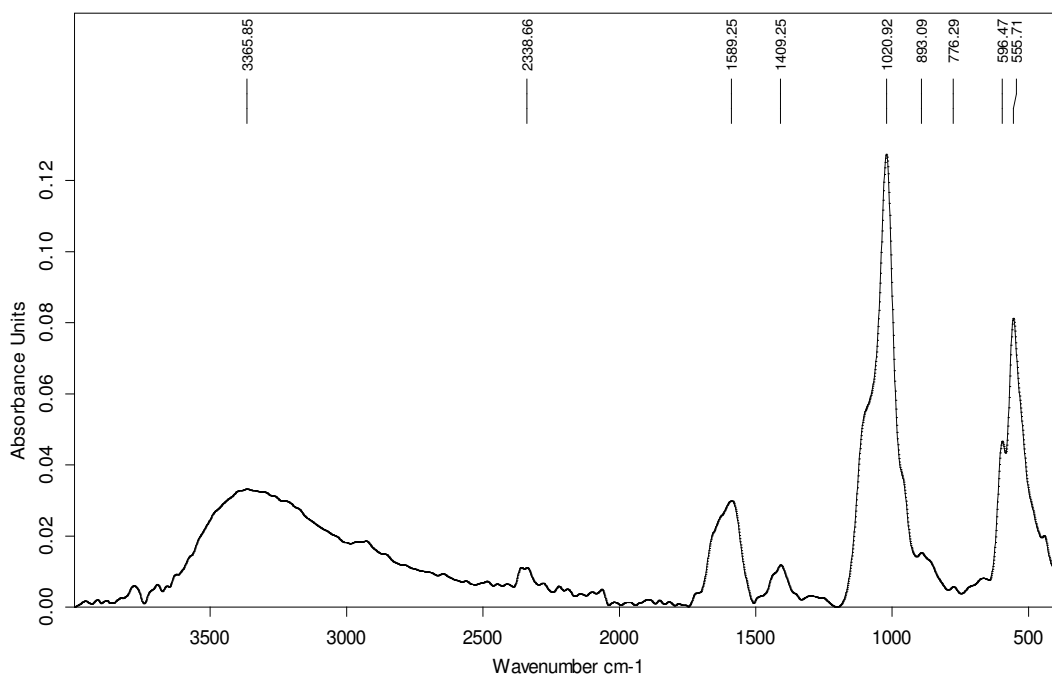


Figure V.53 : Spectre IR de l'échantillon UF₂

C:\Program Files\OPUS_65\MEAS\UF2.0	UF2	ATR platinum Diamond 1 Refl	18/11/2012
-------------------------------------	-----	-----------------------------	------------

V.2.4.2.3 Echantillon UF₃ : en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration (C₃=0,25g/L)

Le pH à 37 C⁰ de la solution en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration C₃= 0,25 g/L reste pratiquement constant durant la réaction.

Tableau V.22 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 0,25g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,56	6,54

I V.2.4.2.3.a Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence de l'extrait de racine de garance à 0,25 g/L, l'échantillon dont l'image MEB est illustrée dans la figure V.54, révèle la présence de gros amas et de quelques granulations sphériques d'apatite associés à quelques cristaux de brushite et de wedellite. Cependant, nous notons que la l'abondance cristalline est moins importante que dans les échantillons précédents,

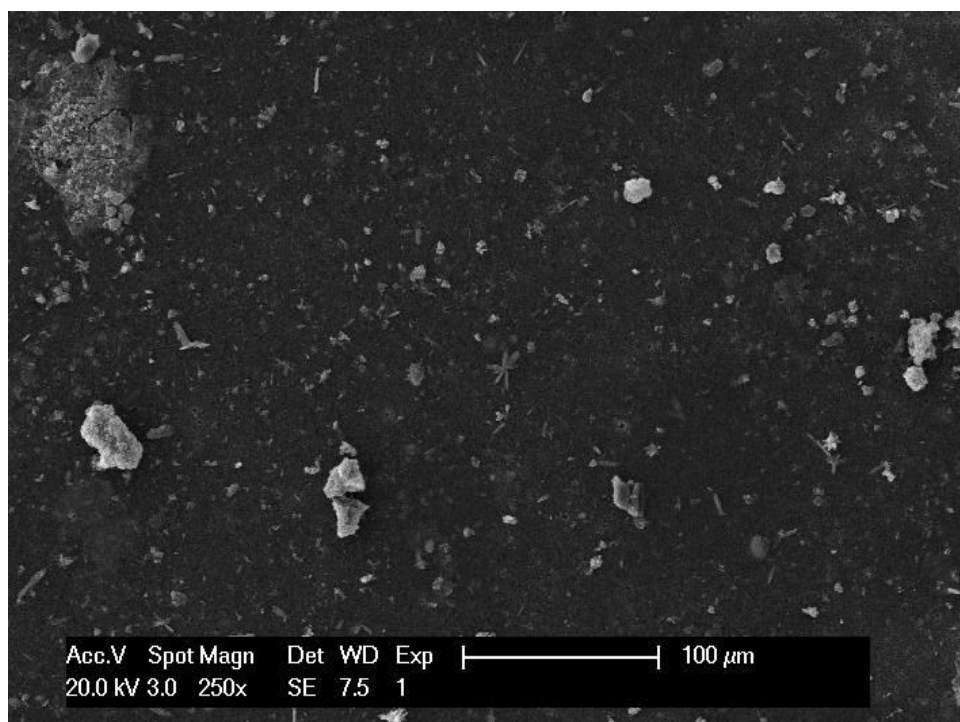


Figure V.54 Micrographie MEB (250x) de l'échantillon UF₃ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 0,25g/L) (vue globale)

La brushite cristallise dans cet échantillon principalement en forme de baguette de petite dimension ou agrégé en forme de gerbe (voir figure V.55(a)). Cependant,

l'abondance et la taille des granulations sphériques d'apatite est plus faible dans cet échantillon comparée à celles des échantillons précédents (voir figure V.55(b)).

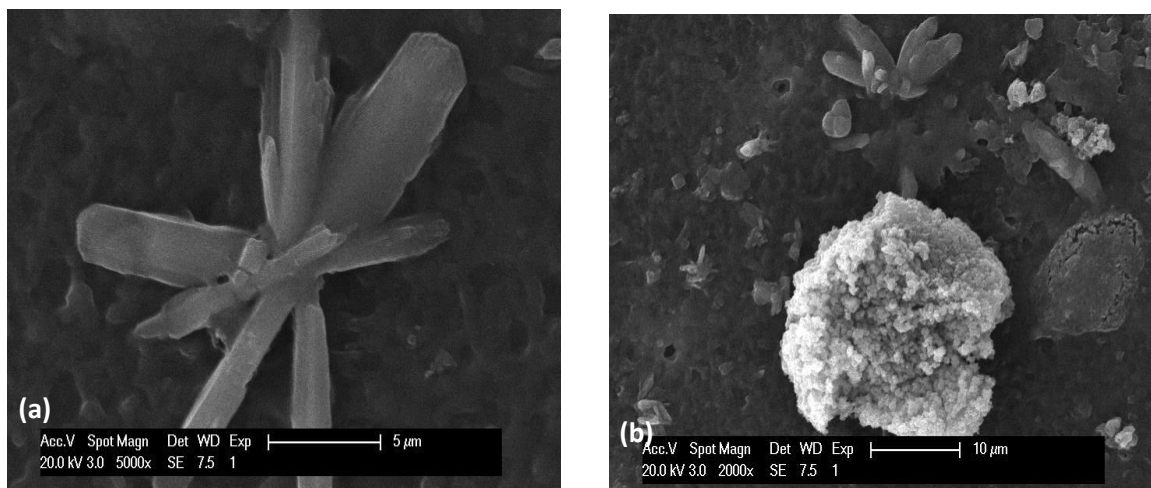


Figure V.55 Micrographie MEB de l'échantillon UF₃ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 0,25g/L) à différents agrandissements. (a) : agrégat des cristaux de brushite en gerbe ; (b) : granulations sphériques d'apatite et des cristaux de brushite agrégés.

V.2.4.2.3.b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

Le précipité formé dans l'urine en présence d'extrait aqueux de la garance, a été soumis à l'analyse par spectroscopie infrarouge. Le spectre obtenu est représenté dans la figure V.56.

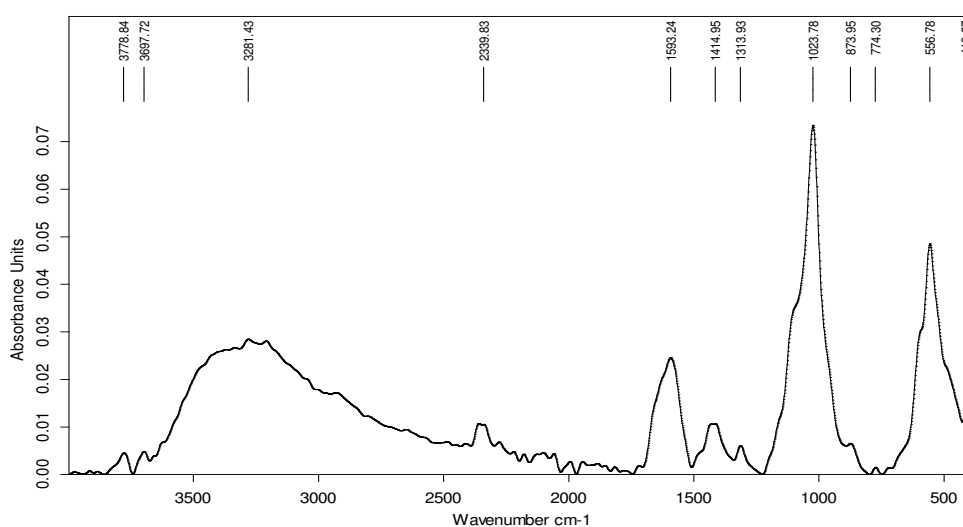


Figure V.56 : Spectre IR de l'échantillon UF₃

Nous observons les bandes attribuées aux vibrations des phosphates entre 1000-1160 cm^{-1} . En effet, l'espèce phosphatique la carapatite est présente comme constituant principal (majoritaire) dans le mélange, elle est indiquée par la bande phosphate à 1023,78 cm^{-1} , asymétrique à gauche, large, épaulée à 1100 cm^{-1} et la bande de valence des carbonates à 1414,95 cm^{-1} . Le spectre IR montre aussi la présence des traces de brushite (épaulements à 1100 et 1000 cm^{-1} et bande à 556,78 cm^{-1}).

La précipitation des phosphates est s'accompagnée par la formation des oxalates de calcium dihydraté (wedellite) indiquée par les bandes à 1313,93 et 774,30 cm^{-1} .

■ V.2.4.2.4- Echantillon UF_4 : en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration ($C_4= 0,5\text{g/L}$)

Le pH de milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration $C_4= 0,5 \text{ g/L}$ reste constant durant la réaction (6.57).

Tableau V.23 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 0,5g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,57	6,57

I V.2.4.2.4.a Analyse par microscopie électronique à balayage

En présence de l'extrait de racine de garance à 0,5 g/L, l'échantillon dont l'image MEB est illustré dans la figure V.57, révèle une très faible cristallisation d'espèces phosphatiques. L'agrandissement de l'image MEB de cet échantillon à 1500 fois montre la présence de rares granulations sphériques blanchâtres d'apatite de taille maximale de 46,31 μm (voir figure V.58(a)). Alors qu'à plus grand agrandissement de l'image MEB à 3500 fois. Nous observons, des petits cristaux asymétriques de brushite en forme de baguettes agrégés radialement d'aspect en gerbe de 25,45 μm de

longueur. Nous notons aussi la présence de quelques granulations sphériques d'apatite ainsi que des petits cristaux d'oxalate de calcium (voir figure V.58(b)).

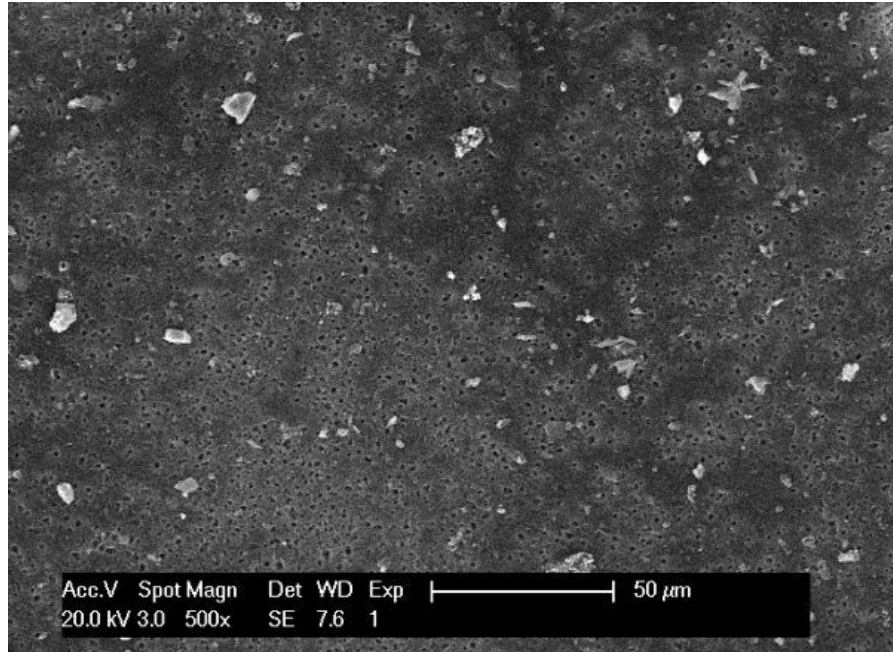


Figure V.57 Micrographie MEB (500x) de l'échantillon UF₄ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 0,5g/L) (vue globale)

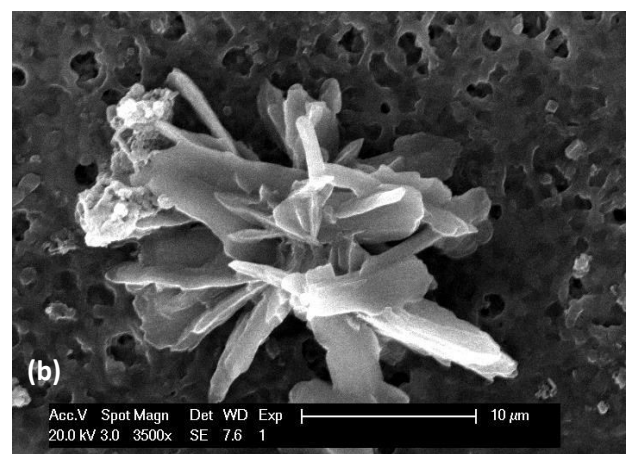
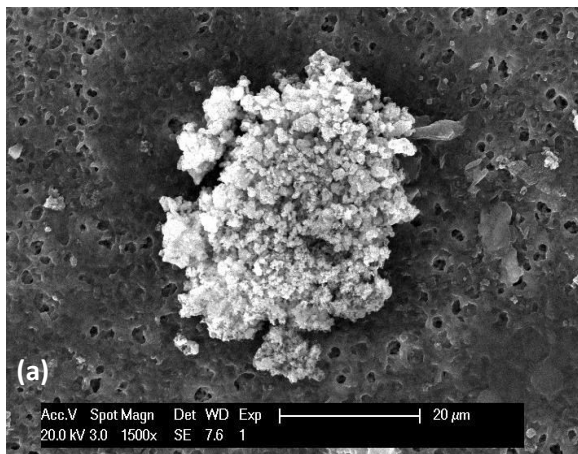


Figure V.58 Micrographie MEB de l'échantillon UF₄ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 0,5g/L) à différents agrandissements. (a) : granulations sphériques d'apatite en amas ; (b) : agrégat de cristaux de brushite en gerbe ;

■ V.2.4.2.5 Echantillon UF₅ : en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration (C₅= 1g/L)

Le pH du milieu de cristallisation des phosphates calciques en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration C₅= 1 g/L est illustré dans le tableau V.24.

Tableau V.24 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 1g/L.

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,61	6,59

V.2.4.2.5.a Analyse par microscopie électronique à balayage

La cristallisation des phosphates calciques en présence d'extrait des racines de garance à 1g/L, montre une abondance plus ou moins importante de granulations sphériques d'apatite. Cependant, l'abondance et la taille des granulations sphériques d'apatite est plus élevée dans cet échantillon comparée à l'échantillon précédent (voir figure V.59).

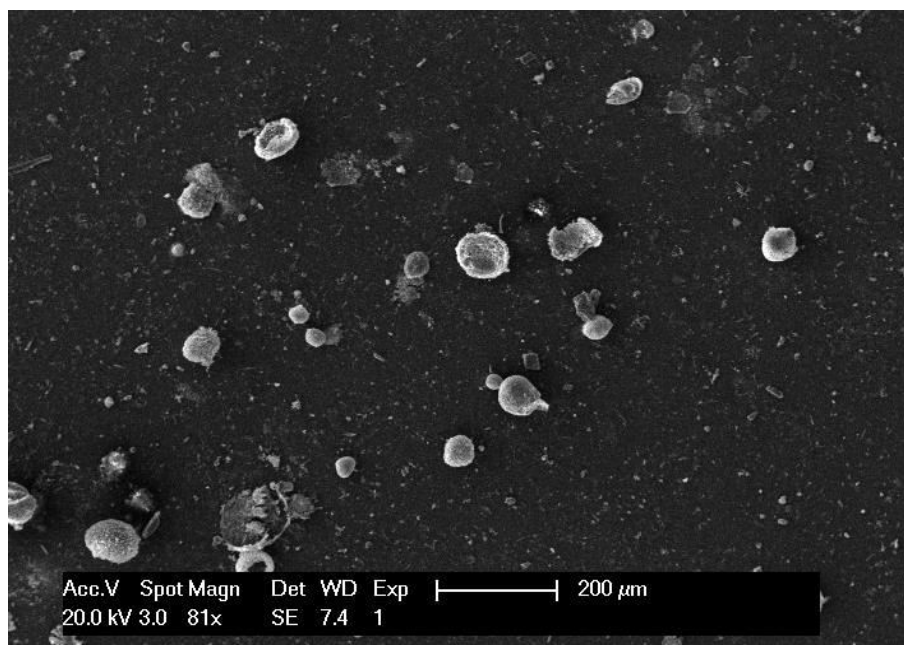


Figure V.59 Micrographie MEB (81×) de l'échantillon UF₅ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 1 g/L) (vue globale)

Examinés de plus près, les granulations sphériques ressemblent en fait à des « cocons », où se logent d'autres sphérules d'apatite. Ces dernières sont entourées d'un cortex formé par un amas d'innombrables petites sphérules (voir figure V.60(a)). Cet échantillon présente, d'une part, des cristaux de brushite agrégés radialement en gerbe de taille de 26,87 μm et d'autre part, quelques cristaux d'oxalate de calcium en forme d'enveloppe (weddellite) (voir figure V.60(b)).

Alors qu'à plus forte agrandissement de l'image MEB à 5000 fois, nous observons, des nombreux petits cristaux asymétriques de brushite en forme de baguette agrégés (voir figure V.60 (c)).

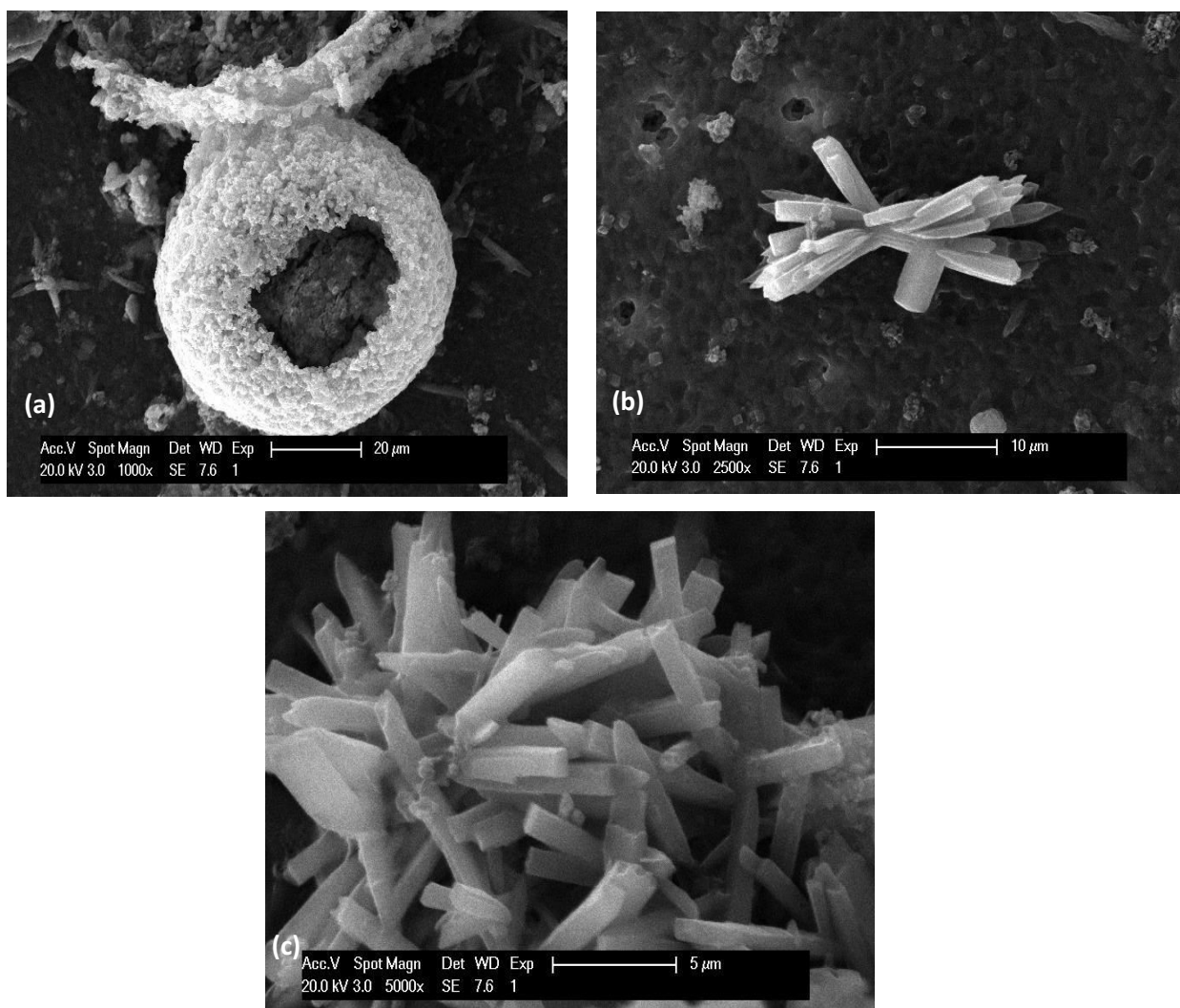


Figure V.60 Micrographie MEB de l'échantillon UF₅ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 1 g/L) à différents agrandissements. (a) : granulations sphériques d'apatite ; (b) : des cristaux de brushite agrégés en gerbe ; (c) : un agrégats formé de cristaux de brushite maclés et en baguette.

■ V.2.4.2.6- Echantillon UF₆ : en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration (C₆= 40g/L)

Le pH de milieu de cristallisation des phosphates calciques en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à la concentration C₆= 40 g/L à 37° C est illustré dans le tableau V.25.

Tableau V.25 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en présence d'extrait de plante à la concentration 40g/L.

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,54	6,16	6,57

V.2.4.2.6.a Analyse par microscopie électronique à balayage

A plus forte concentration d'extrait aqueux de racine de garance (concentration de la solution mère), la cristallisation des phosphates calciques est très faible. En effet, l'analyse MEB (250 fois) de cet échantillon, montre la présence de quelques granulations d'apatite et de rares petits cristaux de brushite (voir figure V.61).

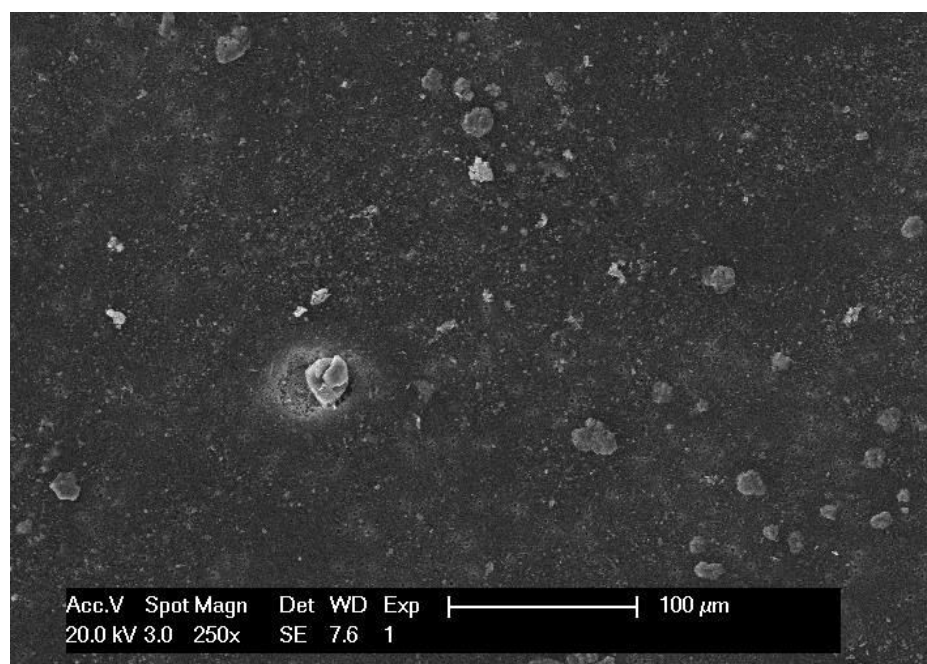


Figure V.61 Micrographie MEB (250×) de l'échantillon UF₆ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 40 g/L) (vue globale)

L'agrandissement de l'image MEB à (800 fois) de cet échantillon, révèle la présence des petites sphères d'apatite de taille maximale de 36 μm , des petits cristaux de brushite en forme de baguette et de quelques cristaux sous forme d'enveloppe d'oxalate de calcium dihydraté (voir figure V.62). Cet échantillon est presque exempt de brushite avec une faible abondance de granulations d'apatites.

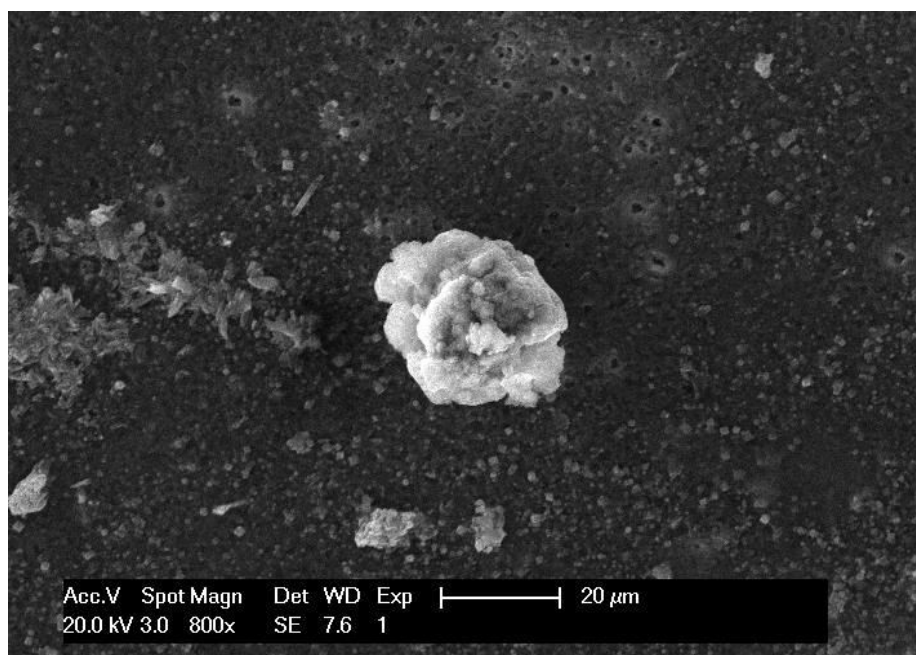


Figure V.62 Micrographie MEB (800 \times) de l'échantillon UF₆ (en présence d'extrait des racines de *Rubia tinctorum* à 40 g/L) (vue globale)

V.2.4.3 Discussion

La mesure du pH du milieu de cristallisation peut être un élément d'orientation de la forme de phosphates précipités. Cependant, lorsque le pH dépasse 6,5, la précipitation des phosphates calciques sous forme de carapatite et PACC est fréquente et ces dernières sont des espèces ayant globalement l'aspect de granulations et d'amas, comme celles observées dans ces échantillons.

En effet, le pH initial du milieu urinaire était de 6,54 à 37 C⁰ ayant favorisé la précipitation de la brushite en absence de plantes médicinales. Ce pH a légèrement augmenté après y avoir induit la cristallisation de la brushite, en présence d'extraits de garance, justifiant ainsi la précipitation spontanée de la carapatite.

Dans le cas de cette étude, les micrographies MEB observées pour les différents échantillons en présence d'extrait aqueux de *Rubia tinctorum* à différentes concentrations, montre d'une part, une diminution remarquable de l'abondance de cristaux de brushite et de granulations d'apatite ainsi que leurs agrégats et d'autre part, une diminution de la taille de ces espèces phosphatiques en comparant avec celle formés en absence des extraits (échantillon de référence).

Globalement, les observations par microscopie électronique à balayage nous ont permis d'apprécier un effet inhibiteur important des extrait aqueux de racine de garance vis-à-vis de la cristallisation de la brushite, en particulier aux fortes concentrations de la plante. En effet, à la concentration la plus élevée de l'extrait (40g/L) la cristallisation de la brushite est efficacement réduite.

Il est connu que les racines de *Rubia tinctorum* en solution aqueuse forment des complexes solubles calciques et magnésiens, prévenant la formation des calculs urinaires (Bezanger et al, 1990 ; Richter, 1936 ; Masawaki et al, 1996). Ses propriétés sont dues peut être à la présence de certains principes actifs comme l'acide rubérythrique, la pupurine et la chinizarine ainsi que des minéraux comme le potassium et le magnésium.

Une autre observation d'un intérêt fondamentale dans la phytothérapie, c'est la formation des cristaux d'oxalates de calcium, dans la plupart des échantillons. L'infusion des racines de cette plante s'avère posséder un effet modérément promoteur vis-à-vis des oxalates de calcium.

Les racines de garance semblent posséder un potentiel inhibiteur très important vis-à-vis de la brushite et des apatites mais à moindre degré. Cette propriété inhibitrice est en faveur de corroborer le savoir traditionnel et pourrait être très intéressante dans la prévention des lithiases de brushite. Il serait aussi intéressant de la tester dans des modèles in vivo afin d'affirmer les vertus de anti lithiasiques vis-à-vis de la brushite et afin de déterminer la dose optimale pour une application en phytothérapie.

V.2.5- Etude de l'effet des extraits aqueux de *Cerasus vulgaris* (queues de cerise) sur la cristallisation de la brushite

V.2.5.1 Cristallisation de la brushite, en absence d'extrait aqueux de *Cerasus vulgaris*

La cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium (la brushite) a été induite en milieu urinaire, en absence des extraits de plante, selon le procédé décrit dans la partie méthodologie. Les valeurs du pH mesuré, sont résumées dans le tableau V.26

Tableau V.26 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en absence d'extraits de plante (échantillon de référence).

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,58	6,65	6,69

V.2.5.1.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

Le précipité obtenu par filtration de la solution (de référence) a été observée par MEB. La micrographie obtenue de l'ensemble du filtre est illustrée dans la figure V.63. Cette observation a révélé une forte cristallisation de phosphate acide de calcium dihydraté (brushite) en aiguilles épaisses ou en baguettes et de granulations sphériques blanchâtres isolées et parfois en amas d'apatite.

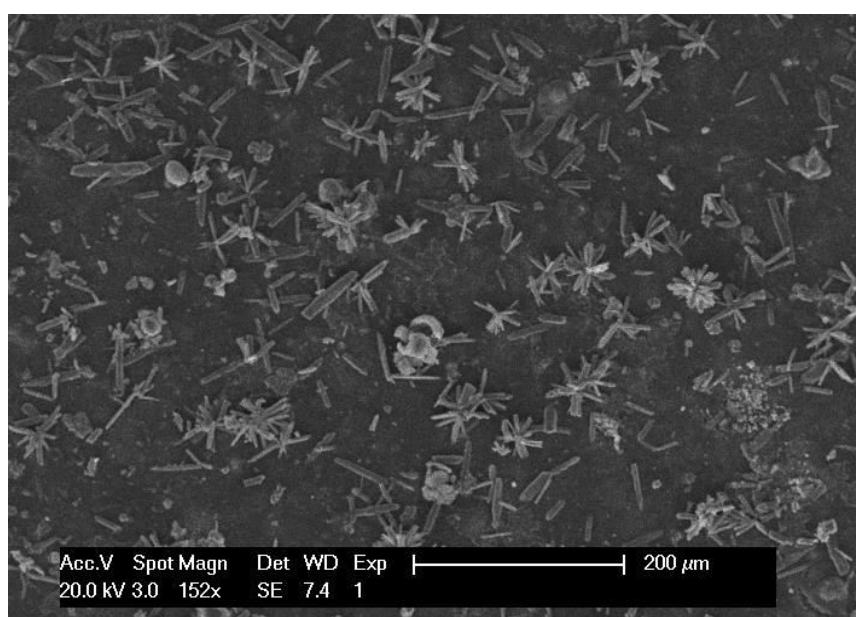


Figure V.63 Micrographie MEB (152x) de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) (vue globale)

L'agrandissement de la micrographie de l'échantillon de référence, révèle la présence d'innombrables cristaux de brushite agrégés radialement d'aspect d'oursin ou en gerbe de taille maximale de 50 μm (voir figure V.64(a)).

D'autre part, cette observation montre aussi la présence de granulations sphériques blanchâtres d'apatite. Ces granulations d'apatite forment des agrégats hétérogènes avec les cristaux de brushite (voir figure V.64 (b)).

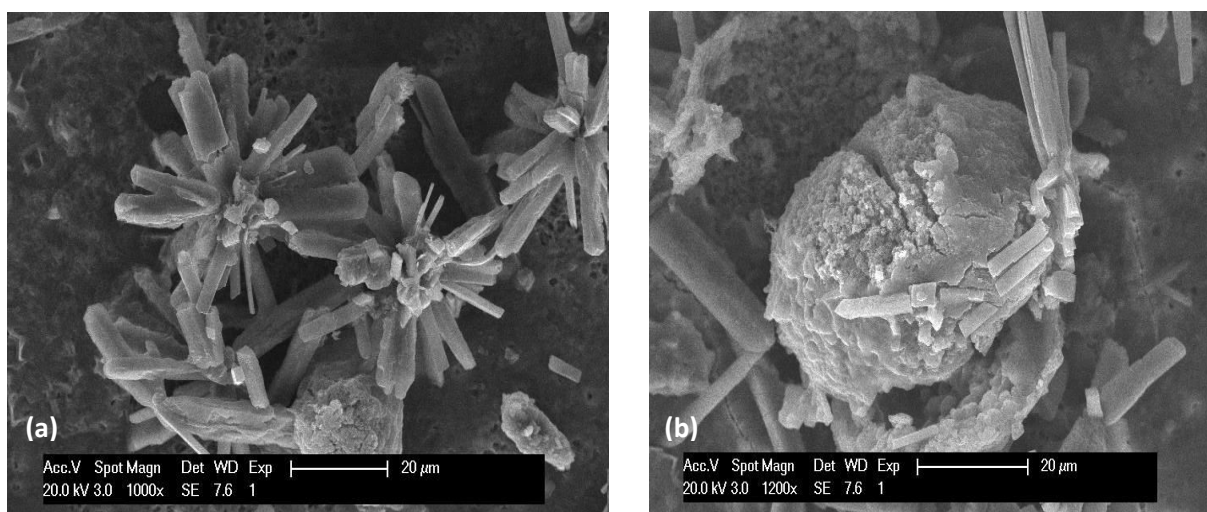


Figure V.64: Micrographie MEB de l'échantillon de référence (sans inhibiteur) à différents agrandissements. (a) : agrégats formés de macles et cristaux de brushite d'aspect en gerbe et de granulations d'apatite ; (b) : granulation sphérique d'apatite en cristallisation hétérogène avec des cristaux de brushite.

V.2.5.2.1 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

Afin de confirmer le type des espèces cristallines formées à la fin de la cristallisation des phosphates en absence d'extrait de plante, l'échantillon de référence obtenu est soumis à une deuxième technique d'analyse spectroscopique (IRTF)

Le spectre IR de cet échantillon (voir figure V.65), montre que l'espèce phosphatique brushite est très dominante. En effet, on note les bandes caractéristiques de la brushite comme suit : triplet dans le domaine 1000 à 1150 cm^{-1} (valence des phosphates), bandes bifide vers 3500 cm^{-1} ainsi que des bandes secondaires à 520 et 570 cm^{-1} . L'épaulement de la bande à $\sim 1150 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée à la présence des traces de carbapatites.

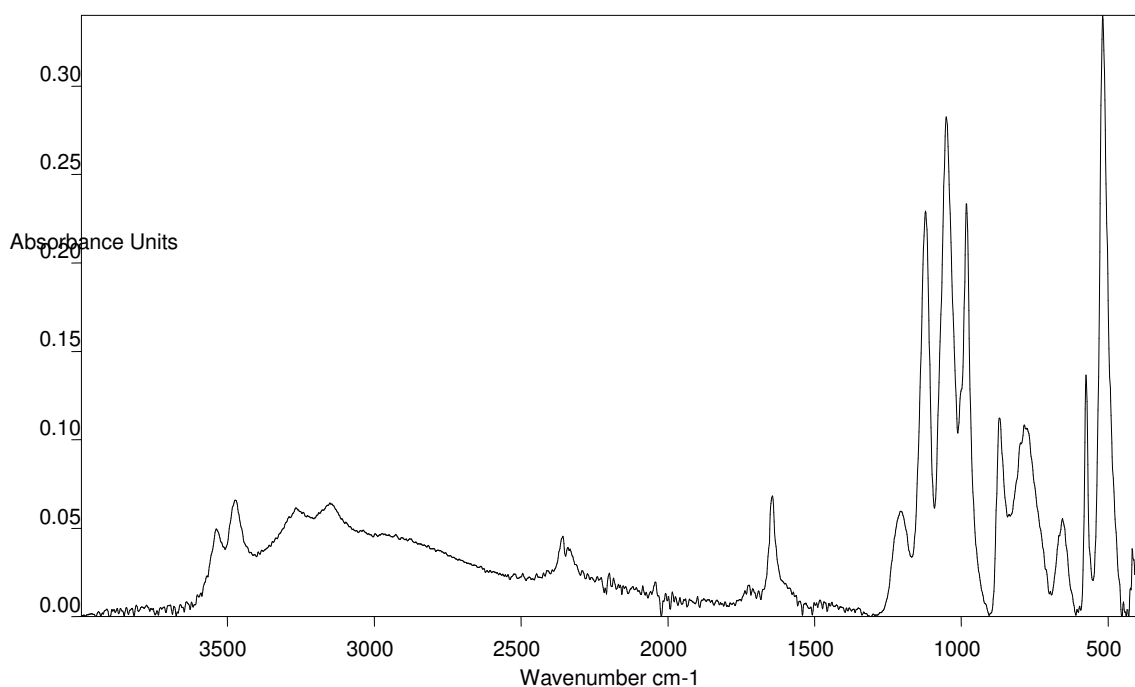


Figure V.65 : Spectre IR de l'échantillon de référence

V.2.5.2 Cristallisation de la brushite dans l'urine, en présence des extraits aqueux de queues de *Cerasus vulgaris*

■ V.2.5.2.1 Echantillon UQ₁, en présence d'extrait aqueux de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₁= 0,0625g/L :

La même méthodologie a été suivie pour tester l'effet inhibiteur des queues de cerise sur la cristallisation des phosphates calciques (brushite) dans l'urine des 24h d'un sujet masculin sans antécédents lithiasiques.

Le pH du milieu de précipitation des phosphates calciques en présence des extraits de *Cerasus vulgaris* est pratiquement constant durant la réaction (voir tableau V.27).

Tableau V.27 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de *Cerasus vulgaris* à 0,0625g/L.

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,58	6,78	6,75

V.2.5.2.1.a Analyse par microscopie électronique à balayage

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB (voir figure V.66) de l'échantillon UQ₁ obtenu en présence de l'extrait de queues de cerise à la concentration 0,0625g/L, montre une cristallisation moins importante comparée à la précédente (de référence).

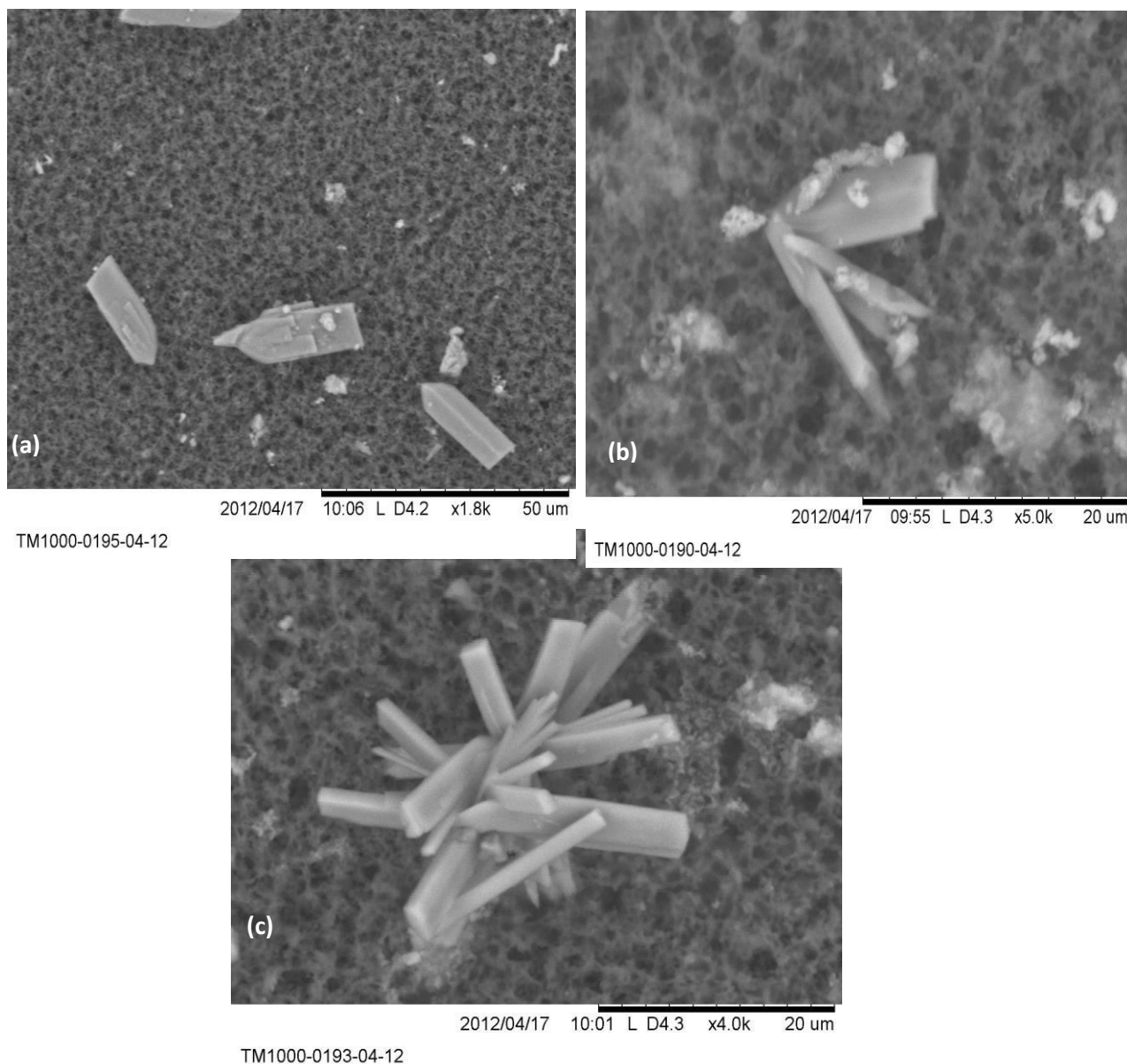


Figure V.66 Micrographie MEB de l'échantillon UQ₁ (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 0,0625g/L) à différents agrandissements. (a) : des macles de brushite et des granulations sphériques d'apatite; (b) : cristallisation hétérogène de cristaux de brushite agrégés avec des granulations d'apatite ; (c) : agrégat de cristaux de brushite en gerbe.

Cependant, nous notons la présence des macles de cristaux asymétrique de brushite de taille moyenne de 26,27 μm , en nucléation hétérogène avec des granulations d'apatite (voir figure V.66(a)). L'agrandissement de la micrographie à 5000 fois révèle une cristallisation hétérogène d'un agrégat de taille de 13,79 μm de cristaux de brushite en forme de gerbe avec des granulations d'apatite (voir figure V.66(b)). Un autre agrégat formé de plusieurs cristaux de brushite en forme de gerbe de taille de 35,42 μm est observé (voir figure V.66(c)).

V.2.5.2.1 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

Le précipité formé dans l'urine à pH avoisinant 6.7, après avoir induit une sursaturation en phosphate sous forme de brushite, a été soumis à l'analyse par spectroscopie infrarouge afin de pouvoir distinguer les espèces formées en fin de cristallisation. Le spectre obtenu est représenté dans la figure V.67

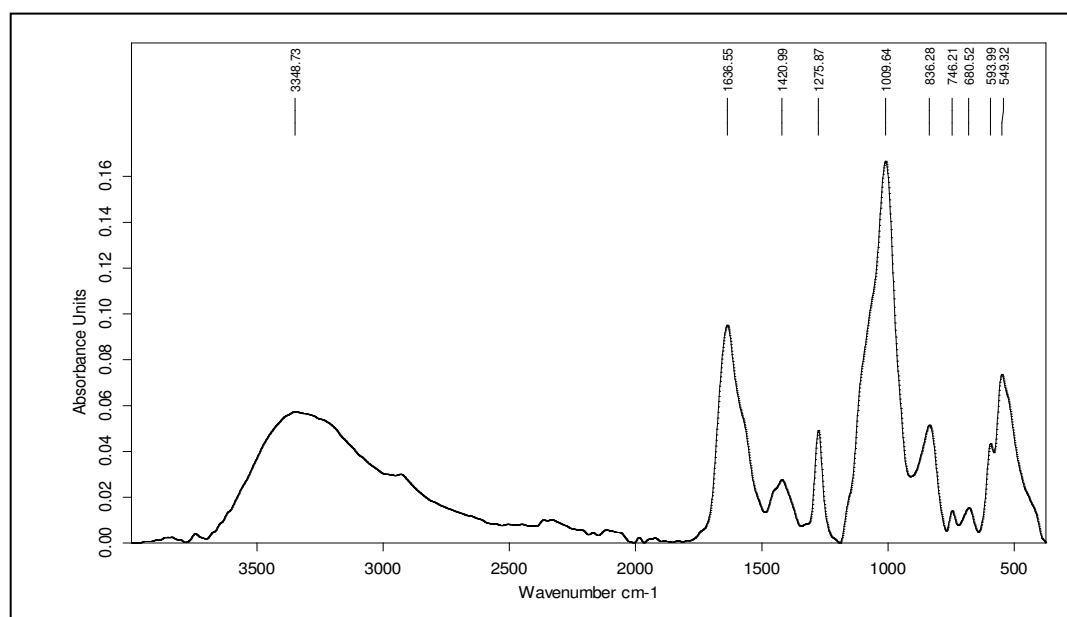


Figure V.67. Spectre IR de l'échantillon UQ₁ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₁= 0,0625g/L)

Il apparaît que la carboxate est majoritaire. En effet, la bande asymétrique à 1009,64 cm^{-1} , large et épaulée à 1150 cm^{-1} est attribuée à la valence des phosphates de la carboxate. On note aussi la bande de valence des carbonates à 1420,99 cm^{-1} . L'hydrogénophosphate de calcium dihydraté (brushite) est présente comme une espèce

secondaire. En effet, un épaulement au voisinage de 1100 cm^{-1} et des bandes à $1636,55$, $680,52$ et $549,32\text{ cm}^{-1}$ sont attribuées à la brushite.

■ **V.2.5.2.2. Echantillon UQ₂, en présence d'extrait aqueux de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₂= 0,125g/L :**

Le pH du milieu de précipitation des phosphates calciques en présence des extraits aqueux de *Cerasus vulgaris* est presque constant (~ 6.6) durant la réaction (voir Tableau V.28)

Tableau V.28 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de *Cerasus vulgaris* à $0,125\text{g/L}$.

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,58	6,66	6,64

V.2.5.2.1.a Analyse par microscopie électronique à balayage

La cristallisation des phosphates calciques, en présence d'extrait des queues de cerise à $0,125\text{g/L}$, montre une abondance de cristaux de brushite et de granulations sphériques d'apatite. La brushite cristallise dans cet échantillon principalement en forme de baguette, en aiguille et en forme de crayon (voir figure V.68(a)). Cette dernière micrographie montre un volumineux agrégat formé de plusieurs faciès de la brushite.

L'agrandissement à 1200fois révèle la présence d'agrégats formés de cristaux de brushite en macles et en forme de baguette de taille moyenne de $39,74\mu\text{m}$ (voir figure V.68(b)). Une autre observation est la présence de granulations d'apatite éparse en cristallisation hétérogène sur des cristaux de brushite agrégés radialement, en forme de gerbe de taille de $44,23\mu\text{m}$ (voir figure V.68(c)).

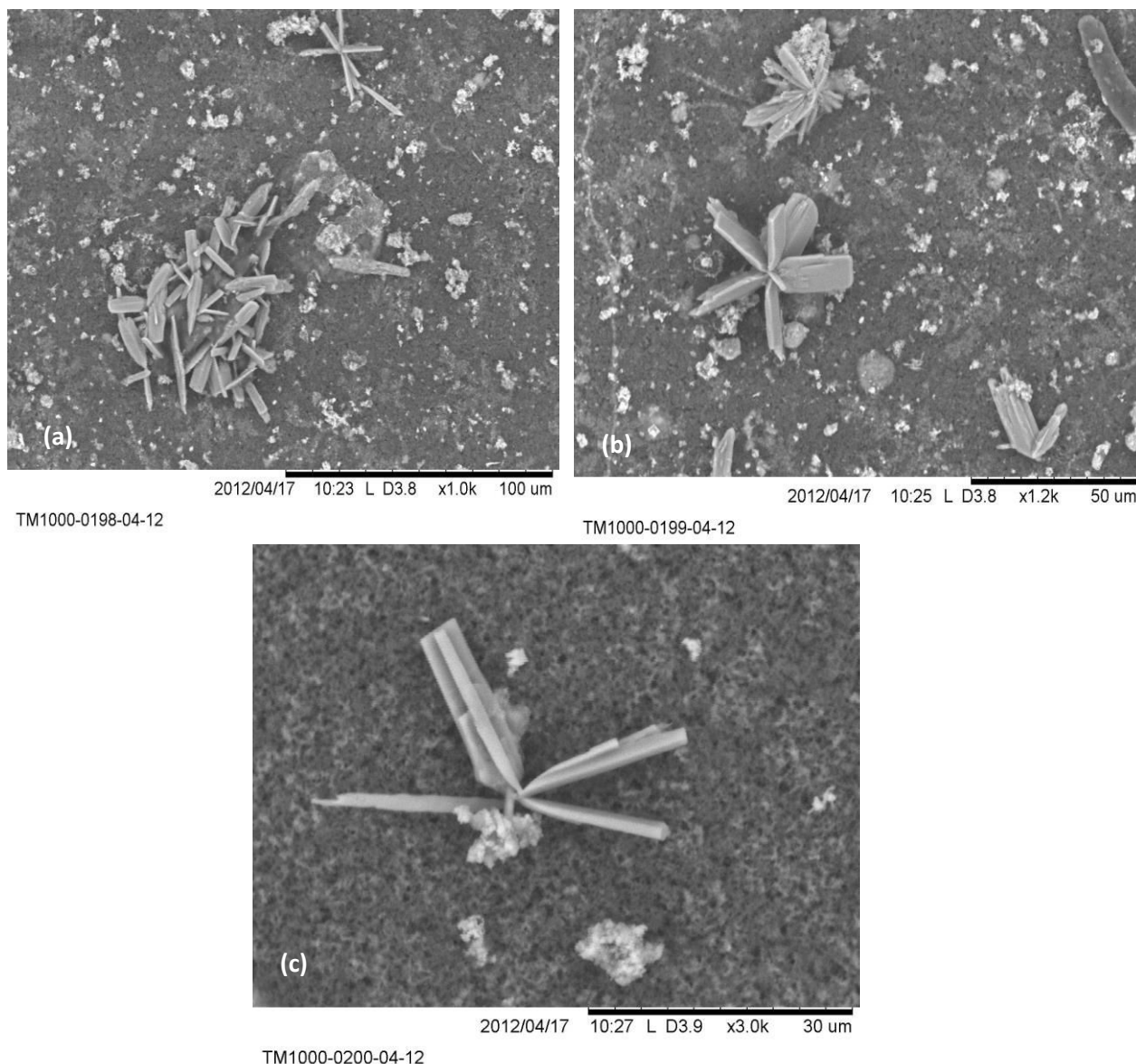


Figure V.68 Micrographie MEB de l'échantillon UQ₂ (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 0,125g/L) à différents agrandissements. (a) : des cristaux de brushite et des granulations sphériques d'apatite; (b) : des agrégat de cristaux de brushite en gerbe et en d'aspect oursin ; (c) : cristallisation hétérogène de cristaux de brushite agrégés avec des granulations d'apatite.

V.2.5.2.1 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

La cristallisation de la brushite en milieu urinaire s'est accompagnée par la formation des granulations sphériques identifiées par MEB comme étant des apatites. Afin de caractériser et identifier ces granulations, nous avons procédé à la caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier de l'échantillon recueilli à la fin du test.

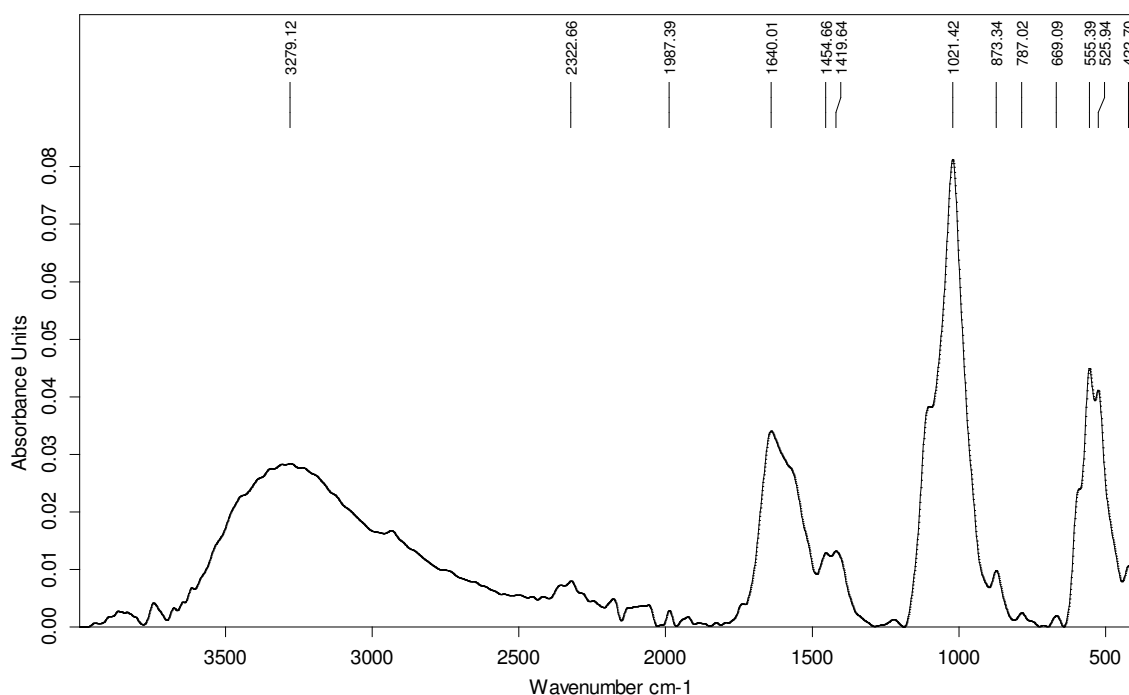


Figure V.69 : Spectre IR de l'échantillon UQ₂ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₂= 0,125g/L)

A première vue, nous observons les bandes attribuées aux vibrations des phosphates entre 1000-1160 cm⁻¹. En effet, l'épaule à 1060 cm⁻¹ est caractéristique de la brushite présente comme constituant secondaire dans un mélange où la carboxypatite (phosphates de calcium carbonaté) est prédominante. Le spectre IR montre aussi la bande clé de carboxypatite (bande asymétrique à 1024,01cm⁻¹ épaulée à 1100 cm⁻¹) et des bandes de carbonate à 1454,66 et 1419,64 cm⁻¹. Par conséquent, le précipité formé est majoritairement formé de carboxypatite. Le glissement de la vibration des phosphates à gauche, témoigne de la présence de PACC.

■ V.2.5.2.3. Echantillon UQ₃, en présence d'extrait aqueux de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₃= 0,25g/L :

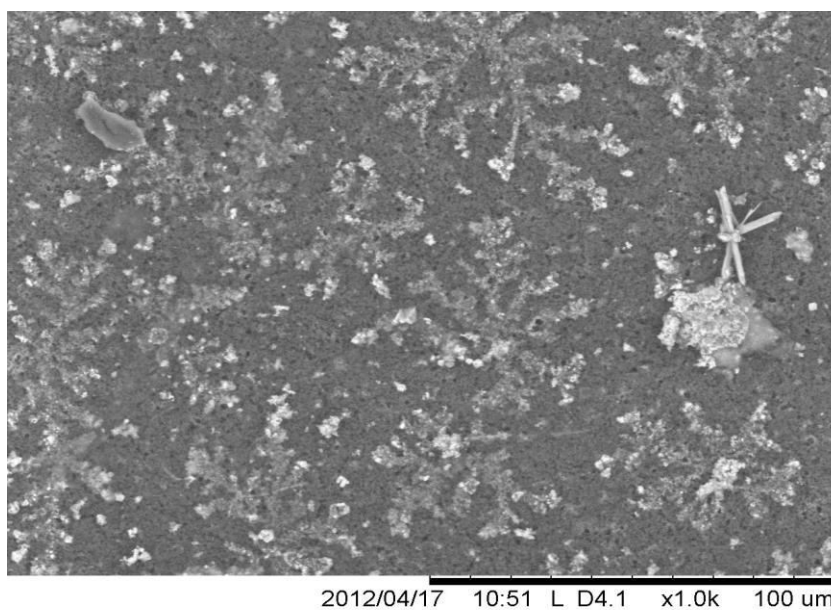
Les valeurs de pH du milieu de cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium (brushite) en présence d'extraits aqueux de *Cerasus vulgaris* à 0,25g/L sont résumées dans le tableau V.29.

Tableau V.29 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de *Cerasus vulgaris* à 0,25g/L.

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,58	6,60	6,65

V.2.5.2.3.a Analyse par microscopie électronique à balayage

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB de l'échantillon obtenu en présence de l'extrait de *Cerasus vulgaris* à 0,25g/L, montre une très faible cristallisation de brushite associée à quelques granulations blanchâtres, et d'autres plutôt grisâtres (voir figure V.70).



TM1000-0206-04-12

Figure V.70 Micrographie MEB de l'échantillon UQ₃ (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 0,25g/L) (vue globale).

L'observation à 3000x, révèle une macule de brushite de taille de 32,69µm associée à quelques granulations blanchâtres d'apatite (voir figure V.71(a)), et un agrégat de brushite en gerbe de taille de 25,76µm (voir figure V.71(b)).

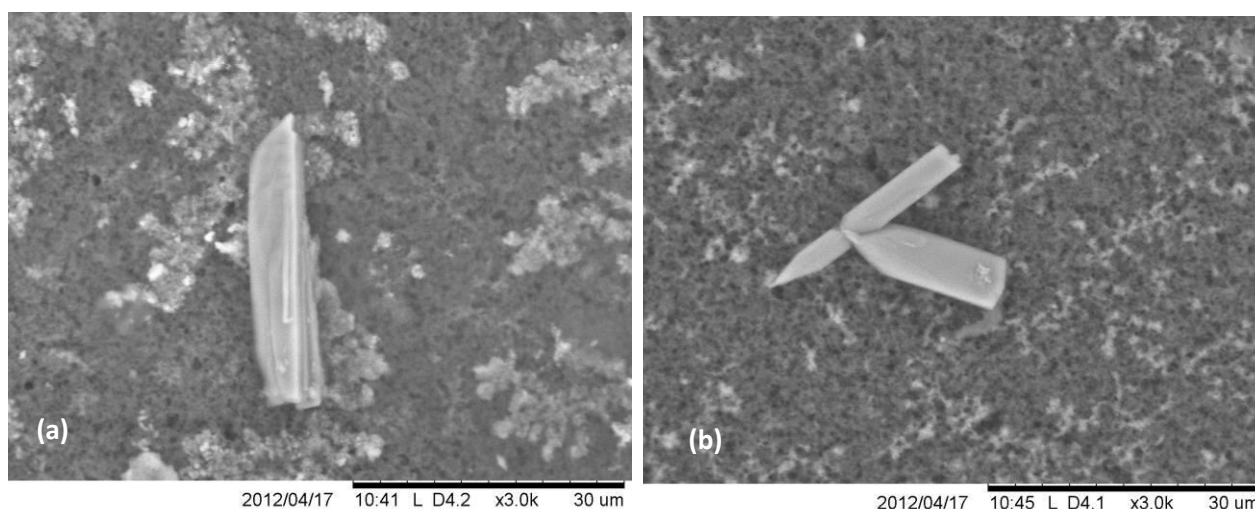


Figure V.71 Micrographie MEB de l'échantillon UO_3 (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 0,25g/L) à l'agrandissement 3000 fois. (a) : un macle de brushite et des granulations sphériques d'apatite; (b): un agrégat de cristaux de brushite en gerbe.

V.2.5.2.1 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

L'échantillon obtenu après filtration de la solution, en présence d'extrait aqueux des queues de cerise (à 0,25g/L) a été caractérisé par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) (voir figure V.72). Il apparaît alors, que le composé majoritaire est la carbapatite (bande asymétrique des phosphates à $1016,10\text{ cm}^{-1}$, des bandes de valence des carbonates à $1422,24$ et 1410 cm^{-1}). L'épaule au voisinage de 1060 cm^{-1} et les bandes à $1641,67$; $666,20$ et $522,69\text{ cm}^{-1}$ sont attribuées à la présence de la brushite. Une autre observation est la présence de PACC (phosphate amorphe de calcium carbonaté), identifiée par l'arrondissement et l'élargissement de la bande à $1016,10\text{ cm}^{-1}$. La présence de deux types d'apatite (carbapatite et PACC) explique la présence de 2 types de granulations (blanchâtre et grisâtre).

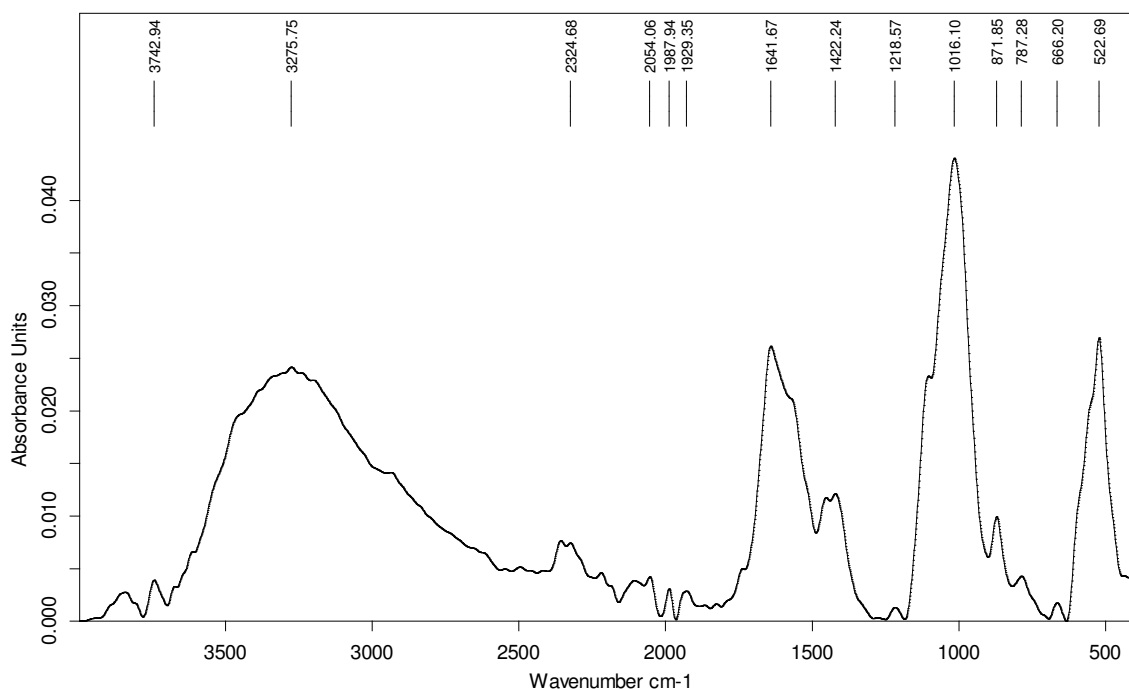


Figure V.72: Spectre IR de l'échantillon UQ₃ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₃= 0,25g/L)

■ **V.2.5.2.4. Echantillon UQ₄, en présence d'extrait aqueux de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₄= 0,5g/L :**

Les valeurs de pH du milieu de cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium (brushite) en présence d'extraits aqueux de *Cerasus vulgaris* à 0,5g/L sont résumées dans le tableau V.30.

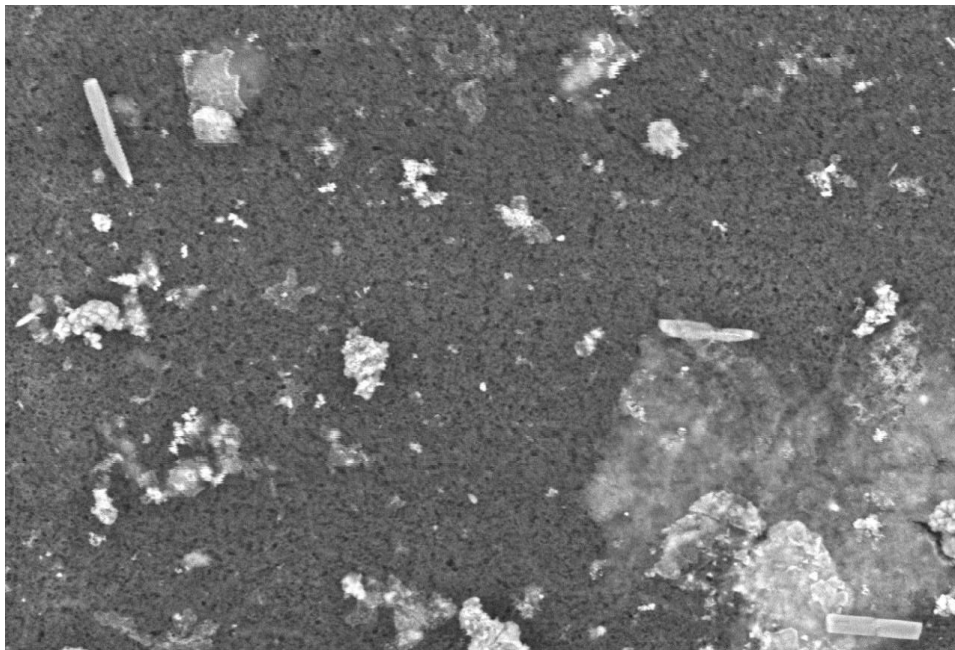
Tableau V.30 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de *Cerasus vulgaris* à 0,5g/L.

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,58	6,76	6,74

V.2.5.2.4.a Analyse par microscopie électronique à balayage MEB

En présence d'extrait aqueux des queues de cerise à 0,5g/L, une faible cristallisation de phosphates calciques sous forme de cristaux de brushite (de taille moyenne de

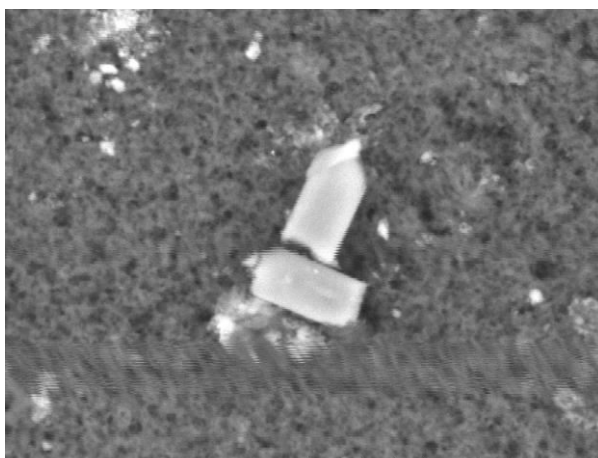
19,54 μm) et de granulations d'apatite blanchâtre est observée, comme le montre l'image prise par MEB (1200fois), illustré dans la figure V.73.



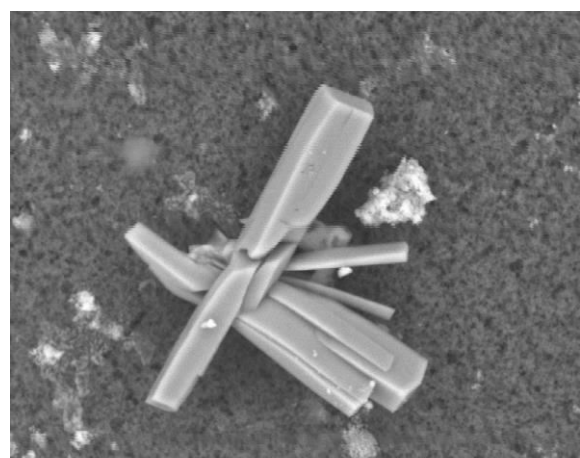
2012/04/17 11:09 L D3.7 x1.2k 50 um

Figure V.73 Micrographie MEB de l'échantillon UQ₄ (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 0,5g/L) à l'agrandissement 1200fois.

Les micrographies illustrées dans la figure V.74(a), révèlent d'une part, un agrégat hétérogène de cristaux de brushite en forme de baguette et en forme de crayon de taille moyenne de 8,50 μm et des granulations blanchâtre d'apatite et d'autre part, un volumineux agrégat de cristaux de brushite en forme de gerbe de taille de 42,30 μm associés à des granulations sphériques blanchâtres d'apatite (voir figure V.74(b)).



2012/04/17 11:04 L D3.7 x5.0k 20 um



2012/04/17 11:15 L D3.7 x3.0k 30 um

Figure V.74 Micrographie MEB de l'échantillon UQ₄ (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 0,5g/L) à différents agrandissement. (a) : des cristaux de brushite et des granulations sphériques d'apatite; (b): un agrégat de cristaux de brushite en gerbe.

V.2.5.2.1 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

Le filtre obtenu à la fin de la cristallisation des phosphates à été soumis à l'analyse infrarouge afin de déterminer les phases cristallines formées.

Le spectre IRTF obtenu (voir figure V.75) montre la présence d'un mélange de composé. La présence de la brushite est attribuée aux épaulements à 1100 et 980 cm^{-1} , les bandes à 1636,43; 671,97 et 554,25 cm^{-1} . La précipitation de la carboxate est majoritairement confirmée par la présence d'une bande asymétrique, large et épaulée à 1019,53 cm^{-1} , bande de valence des carbonates à 1418,18 cm^{-1} et une bande à 594,33 cm^{-1} .

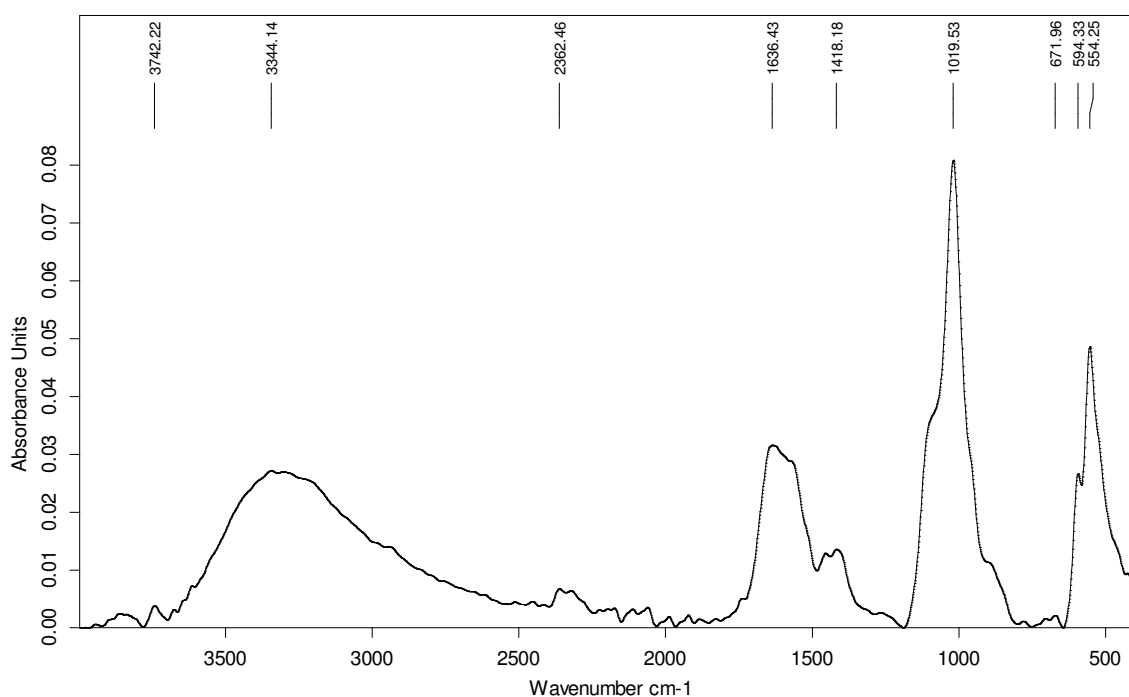


Figure V.75: Spectre IR de l'échantillon UQ₄ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₄= 0,5g/L)

■ V.2.5.2.5. Echantillon UQ₅, en présence d'extrait aqueux de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₅= 1g/L

Les valeurs de pH du milieu de cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium (brushite) en présence d'extraits aqueux de *Cerasus vulgaris* à 1g/L sont résumées dans le tableau V.31.

Tableau V.31: Valeurs du pH (à 37°C) du milieu de cristallisation de la brushite en présence de l'extrait de *Cerasus vulgaris* à 1g/L.

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,58	6,75	6,78

V.2.5.2.5.a Analyse par microscopie électronique a balayage MEB

En présence de l'extrait aqueux de queues de cerise à 1g/L, l'échantillon dont l'image MEB est illustrée dans la figure V.76, révèle une cristallisation de brushite plus élevée que dans tous les échantillons précédents (en présence de la plante). Cette cristallisation de brushite est associée à des granulations blanchâtres d'apatite. et des plaques vitreuses qui font évoquer la présence d'apatite amorphe (PACC)



Figure V.76 Micrographie MEB de l'échantillon UQ₅ (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 1g/L) à l'agrandissement 1200fois.

En effet, les grandes plaques minces aux contours irréguliers, illustrées dans la figure V.76 est une forme particulière de précipitation du PACC et qui sont désignées sous l'appellation de plaques vitreuses. Les granulations de PACC n'ont pas une signification particulière chez les sujets sains. En revanche, chez les lithiasiques c'est un indicateur d'un risque de récurrence (Doré, 2004 ; Daudon et al, 2012).

L'agrandissement de l'image MEB de cet échantillon à 1500fois montre la présence des cristaux de brushite en forme d'aiguille et en forme de baguette de taille moyenne de 13,75µm, ainsi que un agrégat de brushite de taille de 49,23µm en cristallisation hétérogène avec des granulations d'apatite (voir figure V.77(a)).

Une autre observation est la présence des cristaux de brushite maclés en forme de baguette de taille moyenne de 39,23µm entourés par des granulations blanchâtres d'apatite (voir figure V.77(b)).

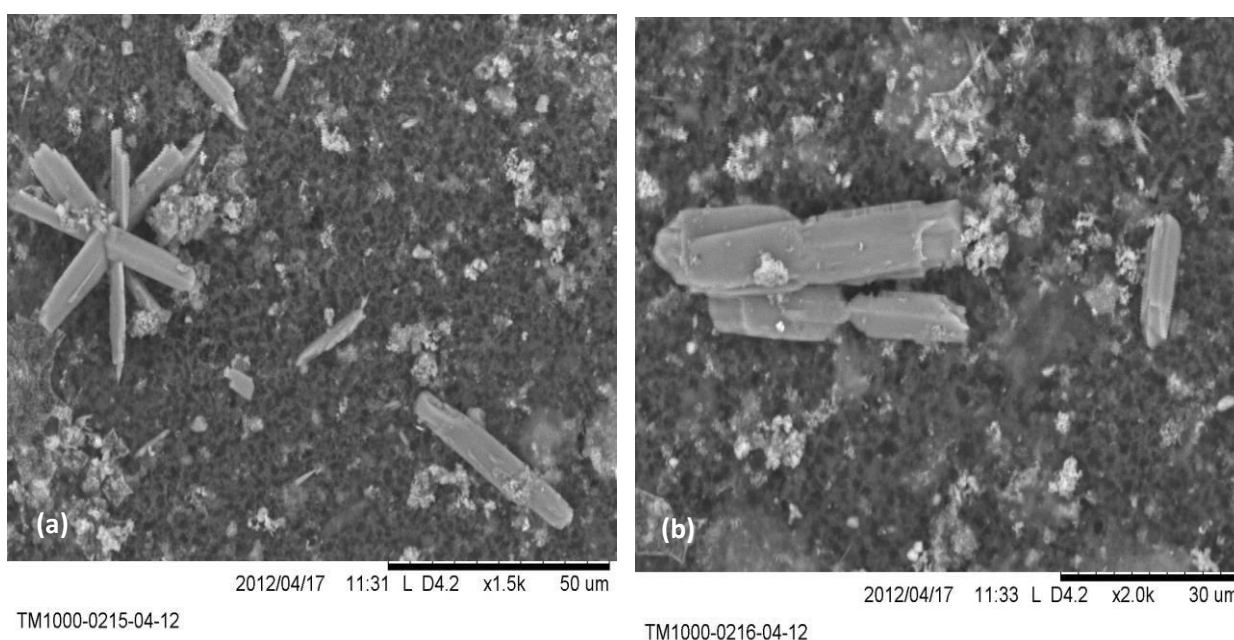


Figure V.77 Micrographie MEB de l'échantillon UQ₅ (en présence d'extrait de *cerasus vulgaris* à 1g/L) à différents agrandissements. (a) : des cristaux de brushite et des granulations sphériques d'apatite; (b) : cristallisation hétérogène de cristaux de brushite maclés avec des granulations d'apatite.

V.2.5.2.1 b Analyse par spectroscopie infrarouge IRTF

Le précipité formé dans l'urine, après avoir induit une sursaturation de phosphate sous forme de brushite, a été soumis à l'analyse par spectroscopie infrarouge afin de pouvoir distinguer les espèces formées en fin de cristallisation. Le spectre obtenu est représenté dans la figure V.78.

Le spectre IR de cet échantillon a l'allure typique de la carbapatite. La bande caractéristique attribuée aux vibrations des phosphates à $1020,73 \text{ cm}^{-1}$. Les épaulements à $(1100 \text{ et } 980) \text{ cm}^{-1}$ sont attribués à la brushite (traces). Le glissement de la vibration des phosphates à gauche $1020,73 \text{ cm}^{-1}$, témoigne de la présence de PACC. Cette dernière attribution confirme la présence de plaques de PACC dans les micrographies MEB de l'échantillon.

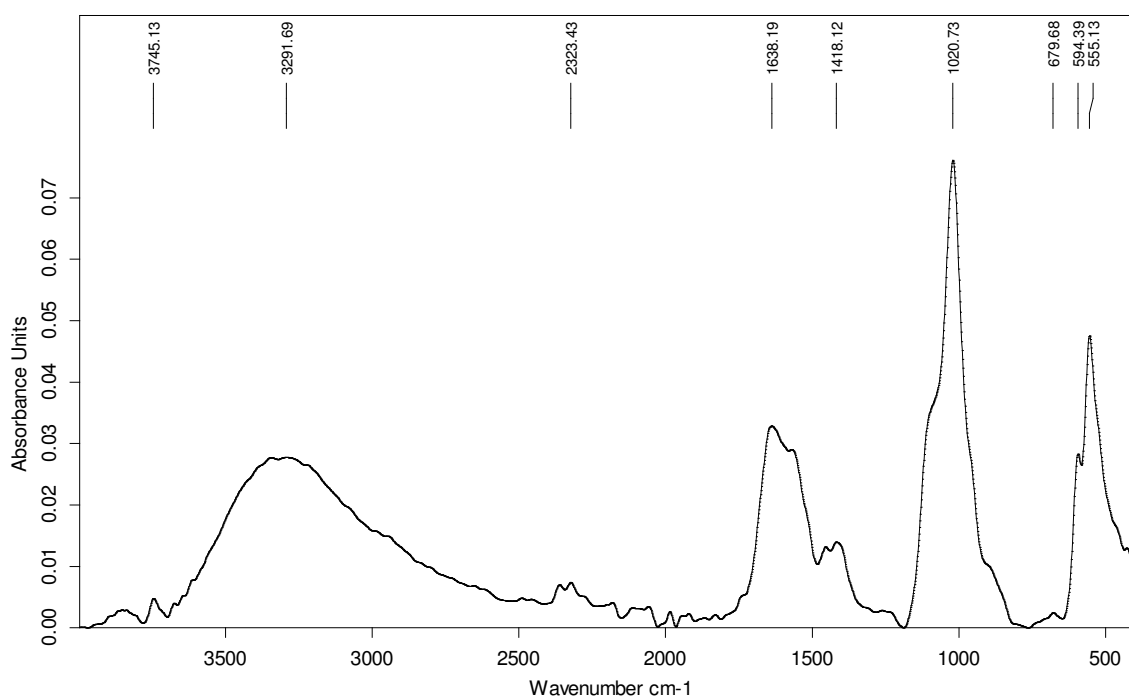


Figure V.78 : Spectre IR de l'échantillon UQ₅ (en présence d'extrait de *Cerasus vulgaris* à la concentration C₅= 1 g/L)

Discussion

Le pH du milieu urinaire est un facteur important dans la cristallisation des phosphates car ces espèces sont essentiellement pH dépendantes (**Daudon, 2003 ; Daudon et al, 2012**). Le pH de l'urine initiale était de 6.58 alors qu'après avoir induit la cristallisation de la brushite, le pH est passé à environ 6.6 pour tous les échantillons (l'échantillon de référence inclus). Cependant, et pour la même acidité du milieu, nous avons observé la cristallisation principalement de la carbapatite, du PACC (en second rang) et la brushite en traces, en présence des extraits de *Cerasus vulgaris*, alors qu'en absence de la plante, la précipitation des phosphates était principalement sous forme de brushite et apatite en traces.

De ces observations, nous déduisons que la cristallisation de la brushite, en présence de *Cerasus vulgaris* évolue vers la carbapatite et le PACC, qui apparemment sont les formes les plus stables dans ce milieu urinaire. Toutefois la brushite, en traces, a été identifiée associée aux apatites.

Sachant que la précipitation des phosphates de calcium est sous la dépendance croisée du pH urinaire et du produit des concentrations molaires phosphocalcique, il apparaît que dans les conditions de ces tests, la précipitation des phosphates sont sous la dépendance de l'action de la plante *Cerasus vulgaris* dont l'effet l'a emporté sur le facteur pH. Toutefois, en présence de l'extrait aqueux de queues de cerise à 1g/L, le MEB révèle une cristallisation de brushite plus élevée que dans tous les échantillons précédents (en présence de la plante), dans un milieu où la carbapatite prédomine. De même que la taille des cristaux de brushite est relativement plus élevée que dans les autres échantillons.

Cependant la cristallisation des phosphates n'est pas importante dans le milieu, comparée, par exemple, à celle en présence de *Malus Pumila*, par conséquent, l'extrait de *Cerasus vulgaris* inhibe modérément la cristallisation de la brushite à faible concentration, mais induit faiblement celle des apatites.

V.2.6- Etude de l'effet des extraits aqueux de *Trigonelle foenum graecum* (Fenugrec) sur la cristallisation de la brushite

V.2.6.1 Cristallisation de la brushite, en absence d'extrait aqueux de Fenugrec

La cristallisation de la brushite a été induite en milieu urinaire, selon le procédé décrit dans la méthodologie. Les valeurs du pH mesuré, sont résumées dans le tableau V.31

Tableau V.31 : Valeurs du pH du milieu de cristallisation de la brushite en absence d'extrait de plante (échantillon de référence).

Le milieu	Urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,69	7,09	7,12

V.2.6.1.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

L'observation en microscopie électronique à balayage MEB des cristaux retenus dans le filtre à la fin de la cristallisation de brushite en absence d'extrait aqueux de plante, montre une forte cristallisation des phosphates calciques sous forme de brushite et d'apatite (voir figure V.79).

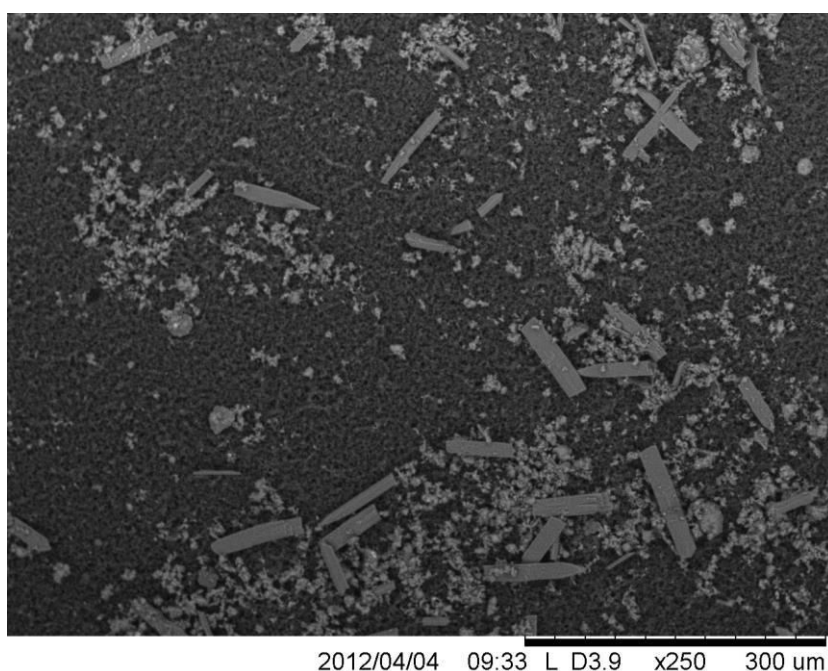
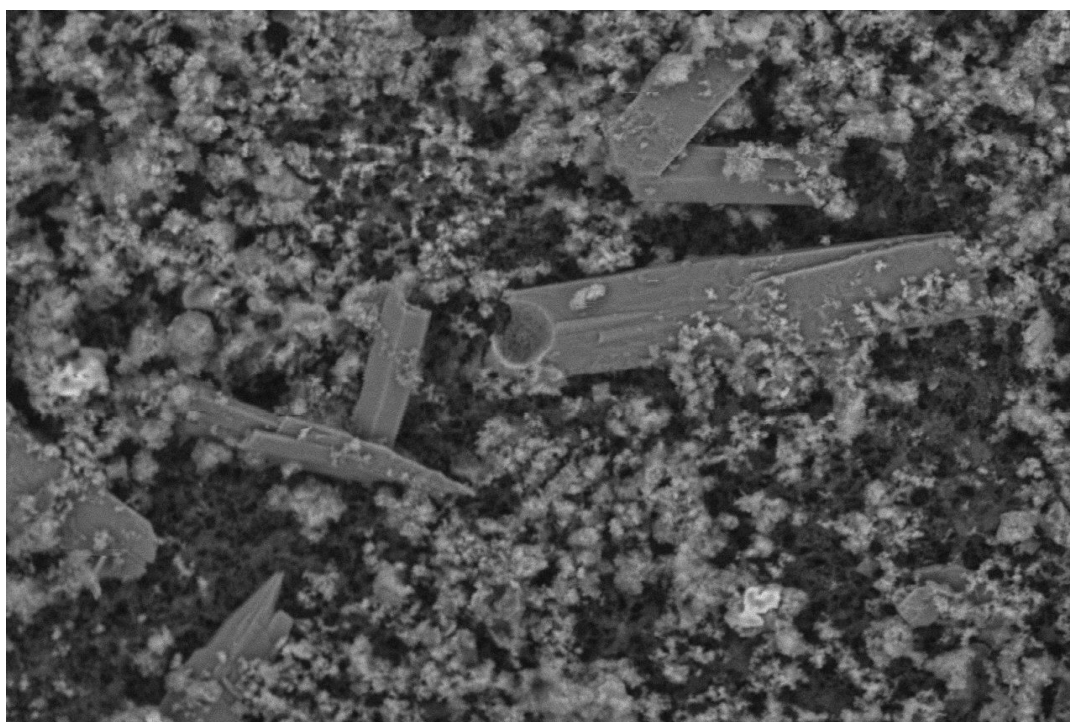


Figure V.79 Micrographie MEB (250x) de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) (vue globale)

La brushite cristallise dans cet échantillon principalement en forme de baguette de taille moyenne de $74,43\mu\text{m}$ ou en forme d'aiguille de taille maximal de $50\mu\text{m}$, ou encore en forme de crayon de taille moyenne de $72,97\mu\text{m}$.

L'agrandissement (800x) de la micrographie de cet échantillon, montre la présence de macles de brushite dont la taille maximale est de $121,42\mu\text{m}$. Cette observation montre aussi la présence de granulations amorphes blanchâtres d'apatite en amas. Ces granulations d'apatite forment des agrégats hétérogènes avec les cristaux de brushite (voir figure V.80).



2012/04/04 09:30 L D3.6 x800 100 um

Figure V.80 Micrographie MEB de l'échantillon de référence (en absence d'extrait de plante) à l'agrandissement 800 fois.

L'identification des granulations blanchâtres n'étant pas identifiées par MEB, nous avons soumis l'échantillon à l'analyse infrarouge.

V.2.6.1.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Le précipité formé dans l'urine a été soumis à l'analyse par spectroscopie infrarouge afin de pouvoir identifier les granulations formées. Le spectre obtenu est représenté dans la figure V.81

A première vue, nous observons les bandes attribuées aux vibrations des phosphates entre $1000-1160\text{ cm}^{-1}$, sous l'allure du triplet caractéristique de la brushite. En effet, les trois épaulements à $(1160 ; 1062 ; 1001,15)\text{ cm}^{-1}$ sont caractéristiques de la brushite présente comme constituant secondaire dans un mélange où le PACC (phosphates amorphe de calcium carbonaté) est prédominant. Les bandes caractéristiques du PACC sont : la bande de vibration des phosphates centrée et arrondie à $1062,89\text{ cm}^{-1}$ et la cassure à gauche de la bande à 666 cm^{-1} . Le spectre IR montre aussi la présence des traces de carbapatite ($1024,01 ; 1454,67 ; 1421\text{ cm}^{-1}$) et des traces d'oxalate de calcium dihydraté (pointes à $1376, 930, 520\text{ cm}^{-1}$). Par conséquent, le précipité formé est majoritairement formé de PACC : PACC+Brushite+ carbapatite+ wedellite. La Prédominance du PACC, alors que le milieu devait être sursaturé en brushite, est induite par l'augmentation du pH du milieu, qui passe de 6,69 à 7,09 puis 7,12. Les bandes à 1276 et 833 cm^{-1} ne sont pas attribués à des phosphates. Il semblerait que ces vibrations soient attribuées à une substance présente dans l'urine du sujet et qui peut être un médicament (pics très fins).

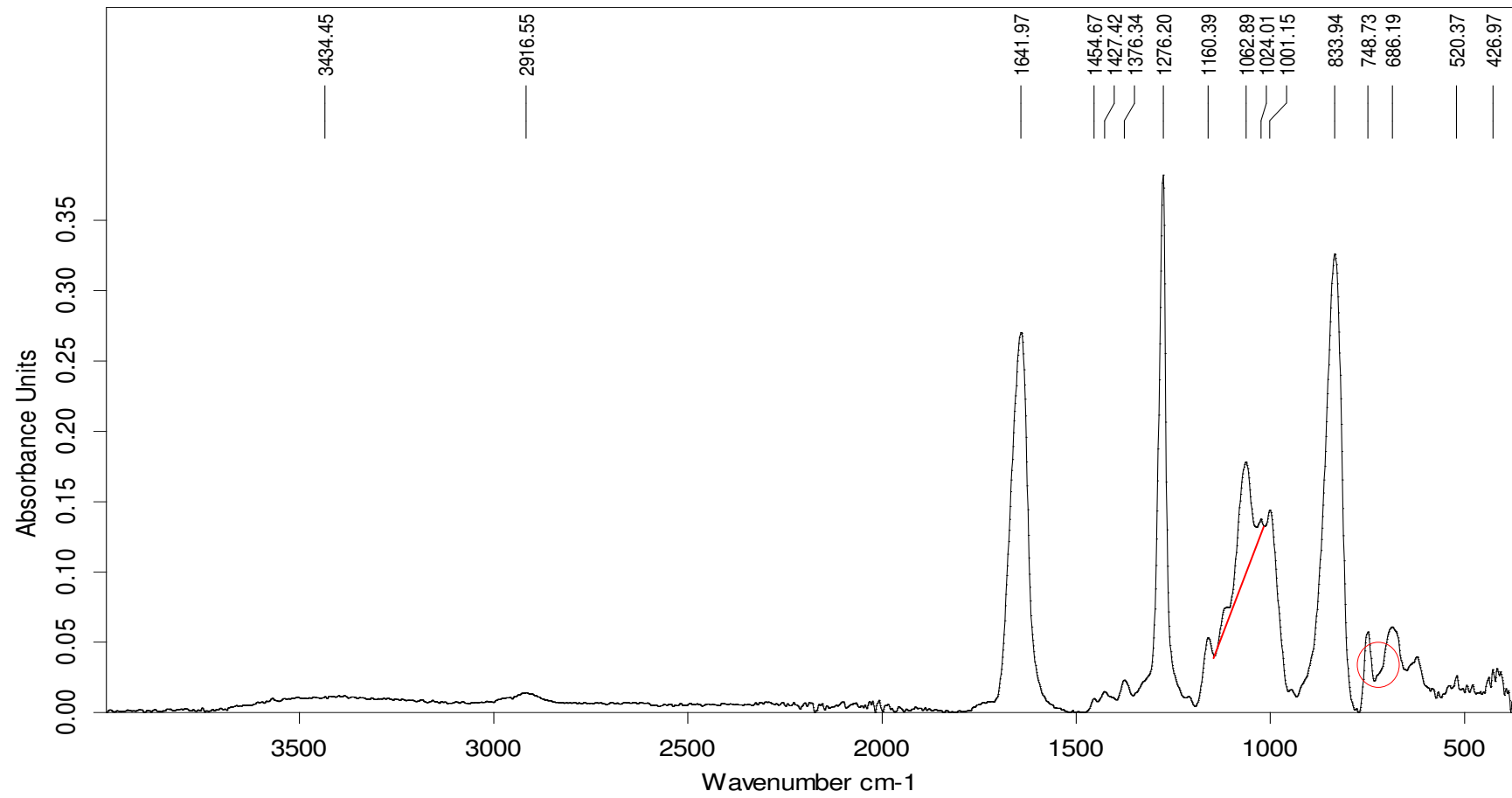


Figure V.81 : Spectre IR de l'échantillon de référence

V.2.6.2 Cristallisation de la brushite, en présence d'extrait aqueux de *Trigonella foenum* (fenugrec)

V.2.6.2.1- Echantillon UH₁ : en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration (C₁= 0,0625g/L)

Le tableau V.32 illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UH₁ testé à 37°C (le pH reste presque constant durant la cristallisation).

Tableau V.32 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH₁ (en présence de l'extrait de *Fenugrec*, à 0,0625g/L

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,69	7,03	7,02

V.2.6.2.1.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

En présence d'extrait aqueux des graines de Fenugrec à la concentration C₁=0,0625g/L, les cristaux observés sont de la même espèce que ceux observés dans l'échantillon de référence. Cependant l'abondance du phosphate de calcium est moins importante dans cet échantillon comparé au précédent (de référence). Cet échantillon présente des cristaux de brushite en forme de baguette entourés par d'innombrables granulations sphériques d'apatite (voir figure V.82).

L'agrandissement à 1000x de l'image MEB de l'échantillon obtenu en présence de l'extrait à 0,0625g/L, révèle la présence d'agrégats formés de cristaux de brushite en macles de taille moyenne de 49,43µm et des cristaux de brushite en forme de baguette de taille maximale de 56,81µm associés aux granulations sphériques d'apatite. Une autre observation importante est la présence des cristaux d'oxalate de calcium en forme d'enveloppe (weddellite) de taille moyenne de 7,95µm (voir la figure V.83).



Figure V.82 Micrographie MEB de l'échantillon UH₁ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,0625 g/L, à l'agrandissement 800x.

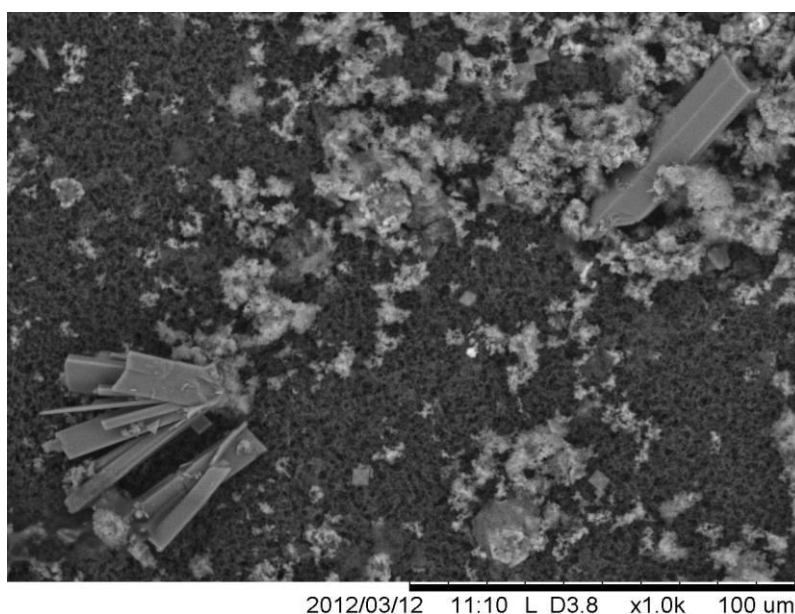


Figure V.83 Micrographie MEB de l'échantillon UH₁ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,0625 g/L) à l'agrandissement 1000x

V.2.6.2.1.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

L'analyse par infra rouge de cet échantillon a donné le spectre illustré dans la figure V.84. Il apparait, la formation de la brushite attribuée aux triplets à 1136,38 ; 1064,63 et 1000,34 cm^{-1} . La précipitation de la carbapatite est montrée par la présence d'une bande de valence des carbonates à 1425,22 cm^{-1} . On remarque aussi, la formation de

quelques traces d'oxalate de calcium dihydraté (weddellite) indiquée par la petite bande à 1374,80cm⁻¹.

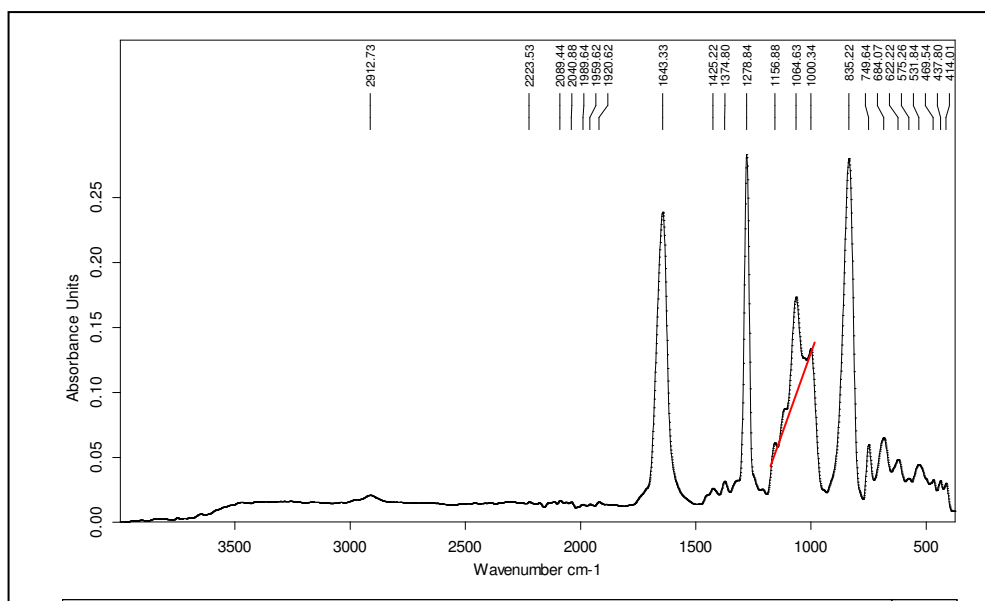


Figure V. 84 : Spectre IR de l'échantillon UH₁ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₁= 0,0625g/L)

V.2.6.2.2- Echantillon UH₂ : en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration (C₂= 0,125g/L)

Les valeurs de pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UH₂ testé à 37°C sont résumées dans le tableau V.33. Le pH reste constant durant la cristallisation.

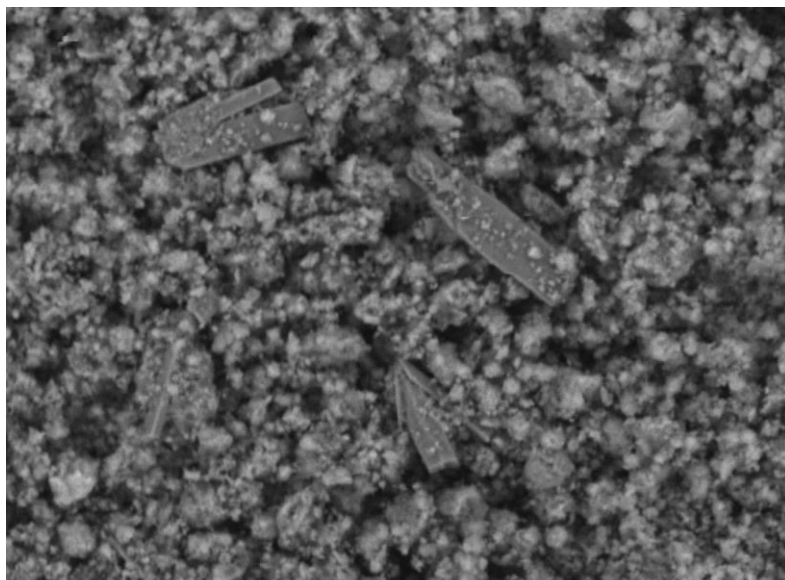
Tableau V.33 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH₂ (en présence de l'extrait de *Trigonella foenum*, à 0,125g/L)

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,69	7,03	7,03

V.2.6.2.2.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB de l'échantillon obtenu en présence de l'extrait aqueux des graines de Fenugrec à la concentration C₂= 0,125g/L, montre une très forte cristallisation des phosphates calciques sous forme de

granulations blanchâtres amorphes d'apatite accompagnées de quelques cristaux de brushite en forme de baguette maclés (voir figure V.85).

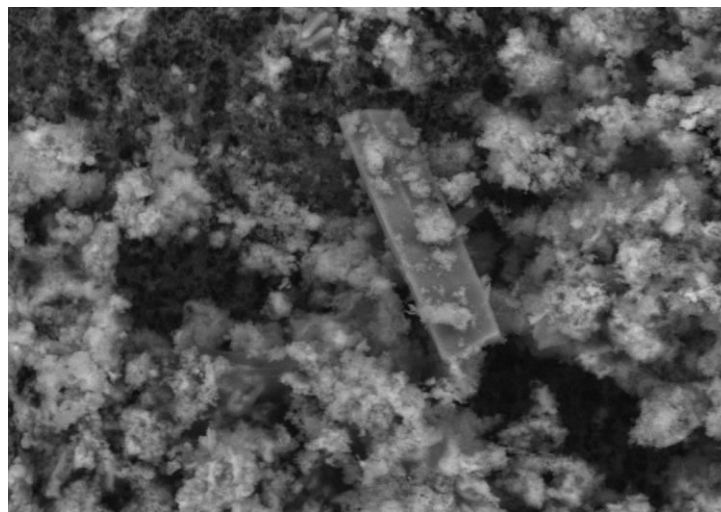


2012/03/12 11:24 L D3.6 x1.0k 100 um

TM1000-0069-03-12

Figure V.85 Micrographie MEB de l'échantillon UH₂ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,125 g/L) à l'agrandissement 1000 fois.

Au plus fort agrandissement de la micrographie MEB à 2000x de cet échantillon, nous observons, des cristaux asymétriques de brushite de 42,11 μm de longueur en cristallisation hétérogène avec de nombreuses granulations sphériques d'apatite (voir figure V.86). Cette observation montre aussi la présence d'un agrégat de cristaux d'oxalate de calcium en forme d'enveloppe de taille de 5,1 μm .



2012/03/12 11:29 L D3.1 x2.0k 30 µm

Figure V.86 Micrographie MEB de l'échantillon UH₂ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,125 g/L) à l'agrandissement 2000 fois.

V.2.6.2.2.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

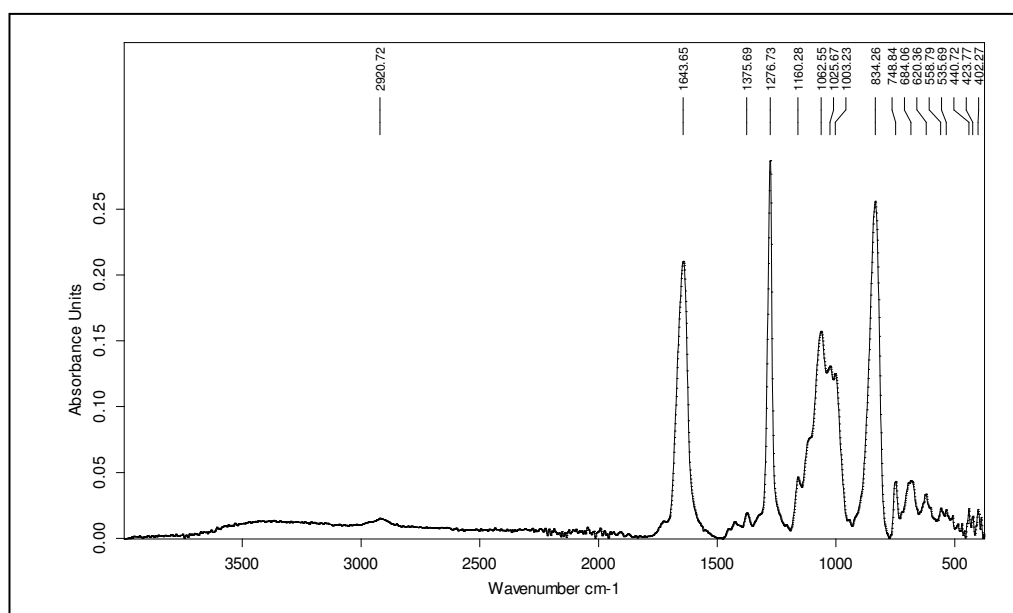


Figure V.87: Spectre IR de l'échantillon UH₂ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₂= 0,125g/L)

C:\Program Files\OPUS_65\MEAS\BENYOUCEF U H2.0 BENYOUCEF U H2 Instrument type and / of accessory 20/06/2012

Seite 1 von 1

Le spectre illustré dans la figure V.87, indique la précipitation d'un mélange de phosphates calciques constitué de brushite, carbapatite et PACC. En effet le triplet à 1160,28 cm⁻¹; 1062,55 cm⁻¹ et 1003,23 cm⁻¹ est attribué à la brushite. La bande à 1025,67 cm⁻¹ est attribuée à la coexistence de phosphate amorphe de calcium carbonaté

(PACC). L'espèce phosphatique la carbapatite est présente dans l'échantillon sous forme de traces (bande de carbonates à $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$). La précipitation des phosphates est accompagnée par la formation des oxalates de calcium dihydraté (weddelite) identifiée par la petite bande clé à $1375,69 \text{ cm}^{-1}$.

■ **V.2.6.2.3 Echantillon UH₃ : en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration (C₃= 0,25g/L)**

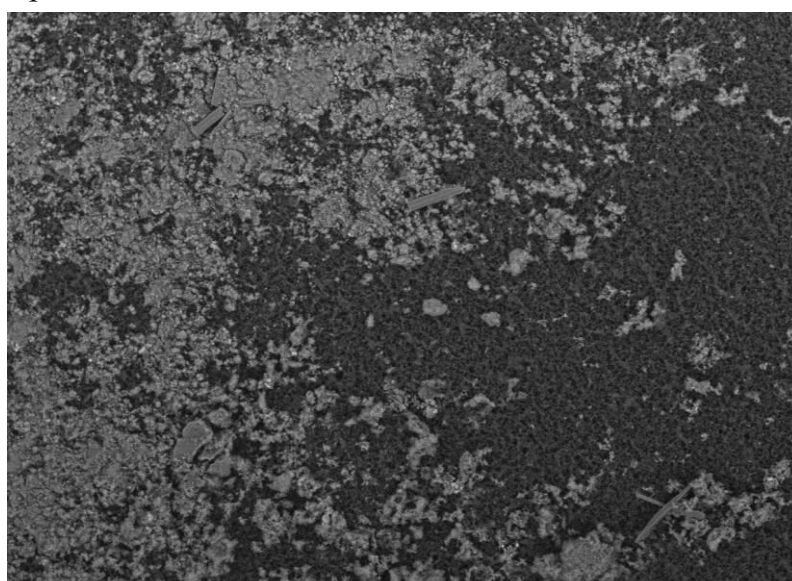
Les valeurs du pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UH₃ testé à 37°C sont résumées dans le tableau V.34 (le pH reste constant durant la cristallisation).

Tableau V.34 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH₃ (en présence de l'extrait de *Fenugrec*, à 0,25g/L)

Le milieu	L'urine Initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,69	7,04	7,03

V.2.6.2.3.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

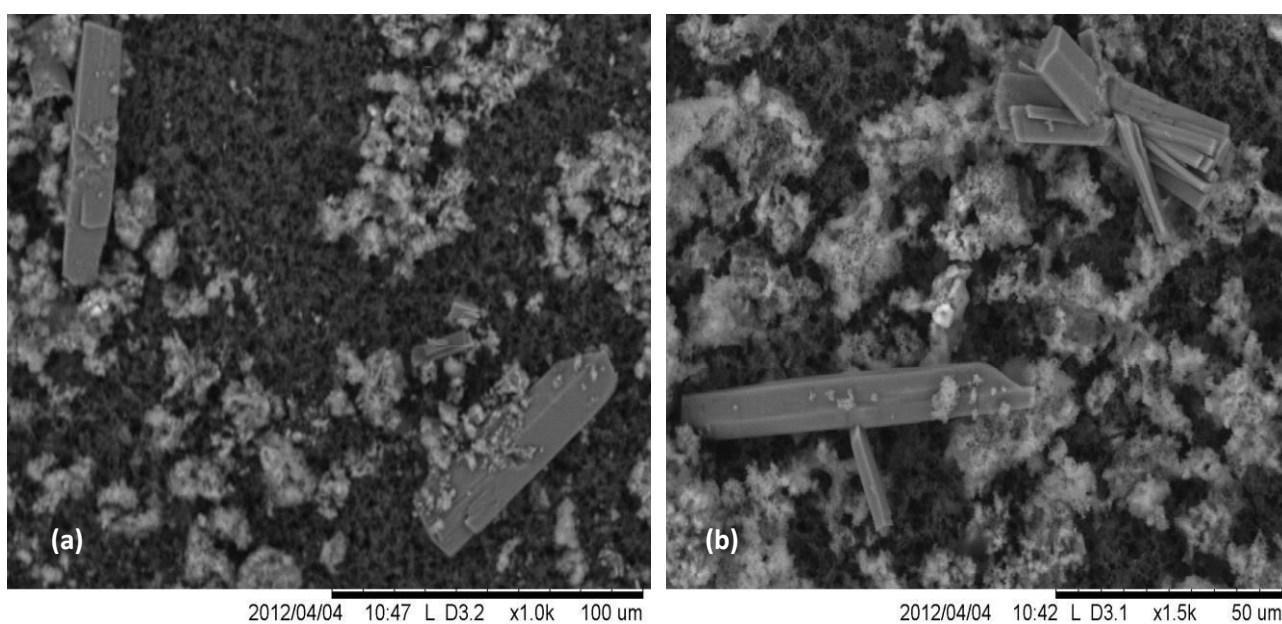
En présence de l'extrait de graines de Fenugrec à 0,25g/L, l'échantillon dont la micrographie MEB est illustrée dans la figure V.88, révèle une cristallisation de brushite moins importante que dans les échantillons précédents avec une abondance de granulations d'apatite.



2012/04/04 10:33 L D3.1 x300 300 um

Figure V.88 Micrographie MEB (300×) de l'échantillon UH₃ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,25 g/L) (vue globale).

Les micrographies MEB illustrées dans la figure V.89 révèlent d'une part, des macles de cristaux de brushite en forme de baguette de taille moyenne de 54,40µm, des granulations d'apatite et des cristaux d'oxalate de calcium (weddellite) en forme d'enveloppe (voir figure V.89(a)) et d'autre part, un agrégat en forme de gerbe formé de cristaux de brushite maclés de taille de 47,72µm associés à des granulations sphériques d'apatite (voir figure V.89(b)).



TM1000-0057-04-12

TM1000-0054-04-12

Figure V.89 Micrographie MEB de l'échantillon UH₃ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,25 g/L) à différents agrandissements. (a) : macles de brushite et des cristaux de weddellite ; (b) : agrégats de brushite et des granulations d'apatite

V.2.6.2.2.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Le précipité formé dans l'urine, en présence d'extrait de graines de Fenugrec à 0,25 g/L) a été analysé par infra rouge (voir la figure V.90).

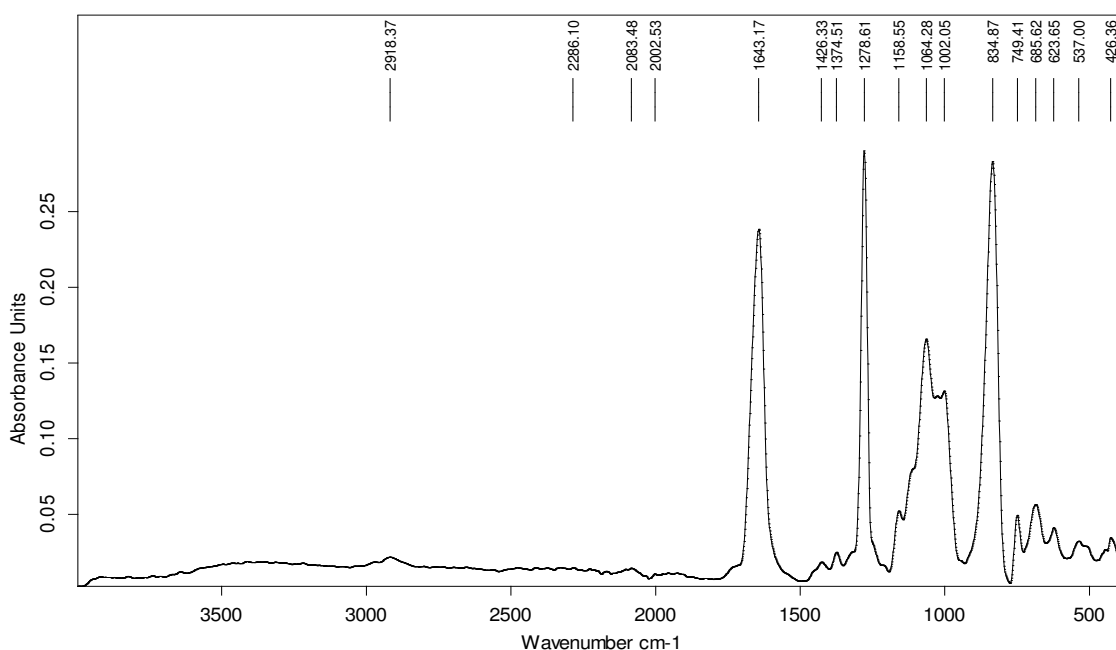


Figure V.90: Spectre IR de l'échantillon UH₃ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₃= 0,25g/L)

Dans le spectre, nous observons les bandes attribuées aux vibrations des phosphates entre 1000-1160 cm⁻¹, sous l'allure du triplet caractéristique de la brushite. En effet, les trois épaulements à (1158,55 ; 1064,28 ; 1002,05) cm⁻¹ sont caractéristiques de la brushite présente comme constituant secondaire dans le mélange. Le spectre IR montre aussi la présence de PACC, des traces de carbapatite (~1030 et 1426,33) cm⁻¹ et des traces d'oxalate de calcium dihydraté weddellite (pointe à 1374,51 cm⁻¹).

■ V.2.6.2.4- Echantillon UH₄ : en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration (C₄= 0,5g/L)

Les valeurs de pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UH₄ testé à 37°C sont résumées dans le tableau V.35 (le pH reste constant durant la cristallisation).

Tableau V.35 : Valeurs du pH (à 37°C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH₄ (en présence de l'extrait de *Fenugrec*, à 0,5g/L)

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37°C)	6,69	7,03	7,02

V.2.6.2.4.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB de l'échantillon obtenu en présence de l'extrait aqueux des graines de Fenugrec à la concentration $C_4 = 0,5 \text{ g/L}$, montre la cristallisation de phosphates calciques sous forme de cristaux de brushite et des granulations d'apatite (voir figure V.91).

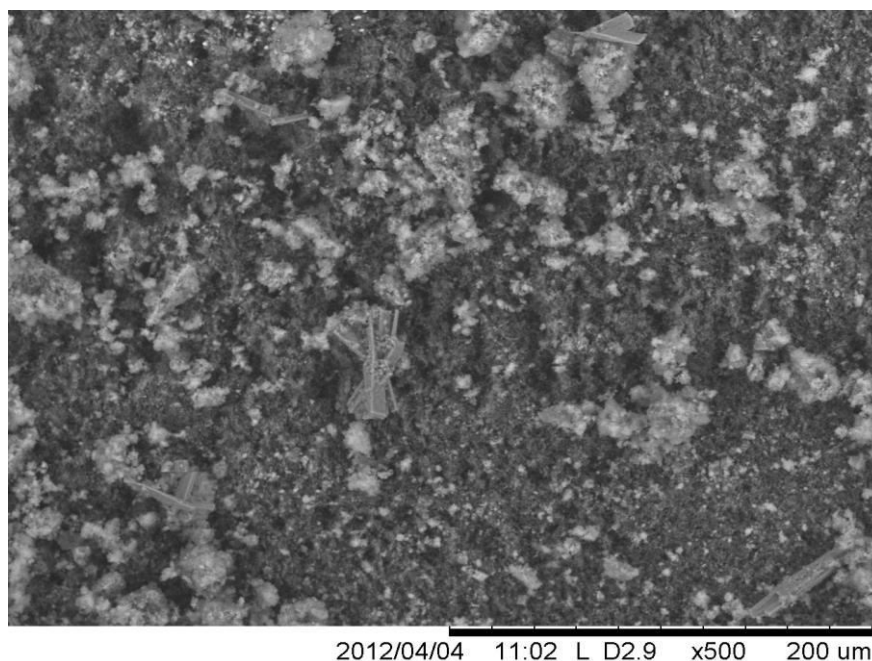
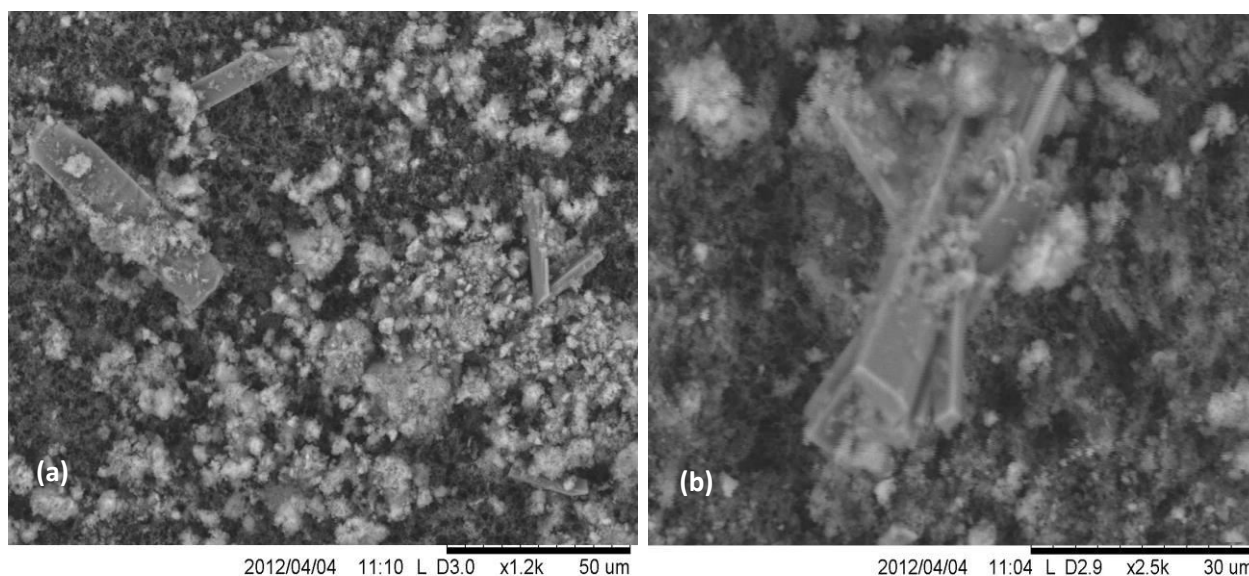


Figure V.91 Micrographie MEB (500×) de l'échantillon UH₄ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,5 g/L) (vue globale).

Cet échantillon présente des cristaux asymétriques de brushite en forme de baguette de taille moyenne de 33,78 µm en nucléation hétérogène avec des granulations sphériques blanchâtres d'apatite (voir figure V.92(a)). Une autre observation importante est la présence de granulations blanchâtres d'apatite en cristallisation hétérogène sur des cristaux de brushite agrégés radialement en forme de gerbe (voir figure V.92(b)).



TM1000-0064-04-12
TM1000-0062-04-12
Figure V.92 Micrographie MEB de l'échantillon UH₄ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 0,5 g/L) à différents agrandissement. (a) : cristaux de brushite en nucléation hétérogène avec des granulations d'apatite ; (b) : cristallisation hétérogène d'un agrégat de brushite en forme de gerbe et des granulations d'apatite

V.2.6.2.2.b Analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Le spectre illustré dans la figure V.93, indique la précipitation d'un mélange de phosphates calciques constitué de PACC, brushite et carapatite. En effet le triplet à $1157,79\text{ cm}^{-1}$; $1063,17\text{ cm}^{-1}$ et $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ est attribué à la brushite. La bande ronde à $1063,17\text{ cm}^{-1}$ est attribuée à la coexistence de phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC). L'espèce phosphatique la carapatite est présente dans l'échantillon sous forme de traces indiquée par une bande asymétrique à droite de la vibration ronde à $1063,17$ avec maximum à $1028,02\text{ cm}^{-1}$ et une bande de carbonates à $1426,32\text{ cm}^{-1}$. La précipitation des phosphates est associée à des oxalates de calcium dihydratée (wedellite) indiquée par les bandes à $1374,91\text{ cm}^{-1}$.

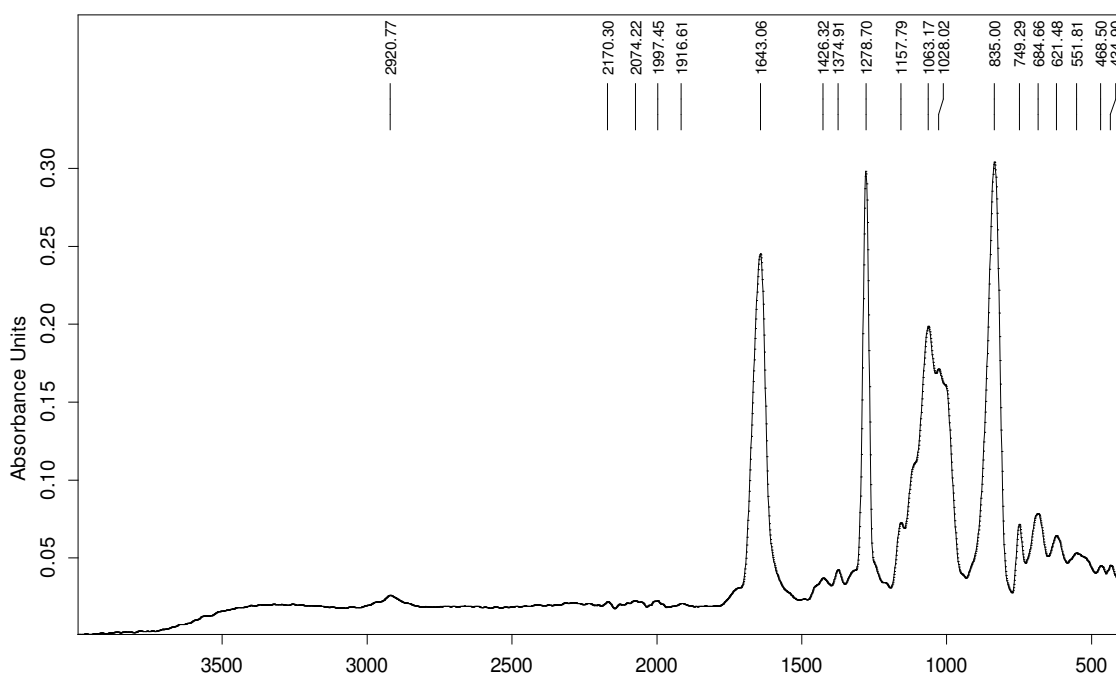


Figure V.93: Spectre IR de l'échantillon UH₄ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration C₄= 0,5g/L)

■ V.2.6.2.5- Echantillon UH₅ : en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à la concentration (C₅= 1g/L)

Le tableau suivant illustre les différents pH du milieu réactionnel pour l'échantillon UH₅ testé à 37⁰C (le pH reste presque constant durant la cristallisation).

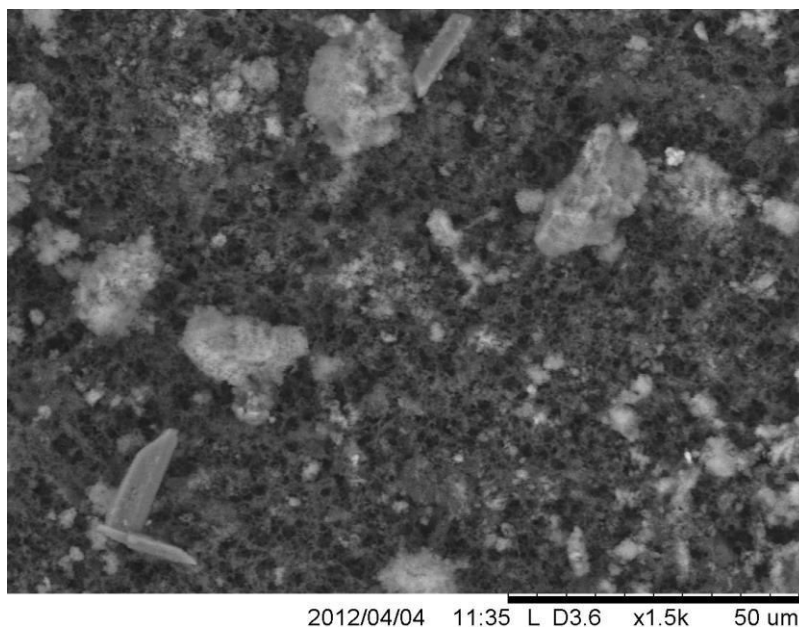
Tableau V.36 : Valeurs du pH (à 37⁰C) du milieu urinaire pour l'échantillon UH₅ (en présence de l'extrait de *Fenugrec*, à 1g/L)

Le milieu	L'urine initiale	Milieu de cristallisation	
		Initial	Final
pH (à 37 ⁰ C)	6,69	7,03	7,01

V.2.6.2.5.a Analyse du précipité par microscopie électronique à balayage

A plus forte concentration d'extrait aqueux de graines de Fenugrec (1g/L), la cristallisation des phosphates calciques sous forme de brushite est moins importante que dans tous les échantillons précédents. En effet, l'analyse MEB (1500×) de

l'échantillon, montre la présence de quelques cristaux asymétriques de brushite en forme de baguette et en aiguille de taille moyenne de $15,75\mu\text{m}$ (voir figure V.94).



TM1000-0070-04-12

Figure V.94 Micrographie MEB de l'échantillon UH₅ (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 1 g/L) à l'agrandissement 1500 fois.

Alors qu'à plus fort agrandissement de l'image à 4000 fois, nous observons, des cristaux asymétriques de brushite maclés en forme de baguette de $33,07\mu\text{m}$ de longueur en nucléation hétérogène avec des granulations sphériques blanchâtres d'apatite (voir figure V.95). Par ailleurs, la taille des cristaux de brushite a diminué comparé à celle de l'échantillon de référence. En effet, en présence de l'infusion à 1g/L, la taille maximale des cristaux asymétriques de brushite a été réduite (de $121,42$ à $33,07\mu\text{m}$).

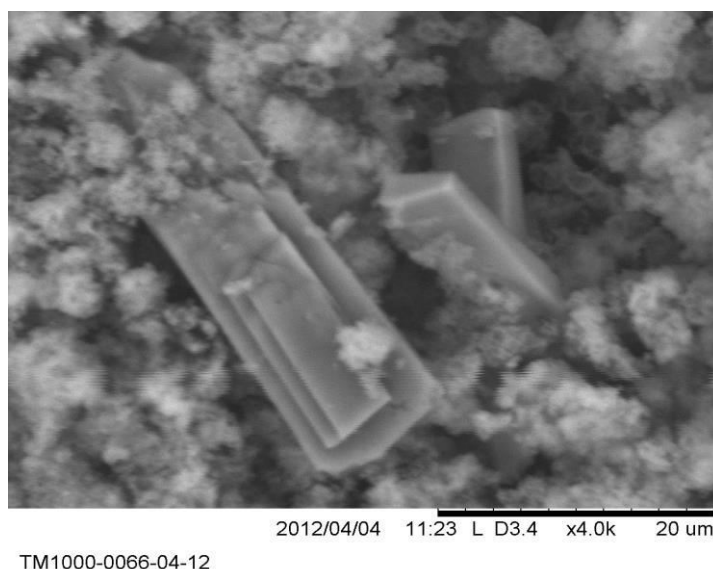


Figure V.95: Micrographie MEB d'un amas présent dans l'échantillon UH5 (en présence d'extrait de *Trigonella foenum* à 1 g/L) à l'agrandissement 4000x

Discussion :

Dans cette approche expérimentale, le pH de l'urine dans laquelle nous avons induit la précipitation de la brushite avoisinait la valeur 7, alors que celui des milieux urinaires en présence des plantes, la valeur dépassait 7. Par conséquent, il est normal d'observer la précipitation des apatites (carapatite et PACC) plutôt que la brushite. En effet, dans tous les essais, en absence et en présence des extraits de fenugrec, le PACC et /ou la carapatite étaient majoritaires et associées à la brushite. Des traces de weddellite ont été aussi observées.

Nous avons remarqué aussi une abondante cristallisation d'apatite et de brushite (à un moindre degré), dans les essais en présence d'extraits de fenugrec aux différentes concentrations allant de 0,0625 à 0,25 g/L. Toutefois cette abondance cristalline devient moins importante aux fortes concentrations en fenugrec (0.5 et 1)g/L.

De même que la taille des cristaux de brushite et l'agrégation diminuent nettement dans ces deux derniers essais. La taille cristalline passe de 121.4µm (essai sans plante) à 56.9 µm (essai 1) à 33 µm (les 2 derniers essais). Cela témoigne de l'action

inhibitrice modérée de la plante à forte concentration vis-à-vis de toutes les étapes de la cristallisation (nucléation, croissance et agrégation) de la brushite.

Il serait très intéressant de tester les extraits concentrés de fenugrec dans un modèle in vivo pour affirmer et appuyer cette vertu qui peut être d'un intérêt fondamentale pour la phytothérapie et orienter les investigations cliniques vers des évaluations pertinentes afin de déterminer la dose optimale pour une efficacité clinique optimisée.



Conclusion Générale

Conclusion Générale

Notre principal souci, le long de cette étude, est de déterminer l'action des plantes médicinales à différentes concentrations sur la cristallisation de phosphates calciques, deuxième espèce lithogène fréquente après les oxalates de calcium, afin de prévoir si une cure à base de plantes médicinales prévient le risque de cristallisation de phosphates, dans l'urine. En effet, ce risque peut entraîner fatalement la formation de calculs urinaires de type phosphocalcique.

Pour ce faire, nous avons choisi d'étudier la cristallisation de l'hydrogénophosphate de calcium (brushite) en induisant une hyperphosphaturie, dans deux modèles : modèle conductimétrique (urine artificielle) et modèle biologique (urine totale) afin de mieux cerner l'action des plantes médicinales sur ce risque lithogène accru.

Le choix, de l'espèce lithogène dans la présente étude, repose sur le fait que les calculs urinaires de brushite soient des calculs très durs, récidivants et difficiles à fragmenter par la lithotripsie. Afin d'éviter la récurrence de ce type de calculs, une prévention efficace, qui s'oppose à la cristallisation de la brushite, s'avère nécessaire.

Nous avons au départ tenté de suivre la cinétique de cristallisation de la brushite dans un modèle turbidimétrique, mais sans succès car le trouble formé par précipitation des phosphates ne permettait pas de mesurer facilement l'absorbance. Par conséquent, nous avons opté pour le modèle conductimétrique qui se justifie autant que le modèle turbidimétrique, par sa simplicité à mettre en œuvre et sa facilité à reproduire des conditions expérimentales proches du milieu urinaire du sujet lithiasique (agitation constante, température maintenue à 37°). Nous avons mesuré la conductivité de la solution, en continu et déduit tous les paramètres conductimétriques. Six essais ont été réalisés dans des conditions identiques. Nous avons calculé la moyenne des pentes (soit -74,6) caractérisant la croissance cristalline dans un intervalle (0,5-13) mn, le coefficient de corrélation R^2 (>0.99) et le coefficient de variation était inférieur à 10%, témoignant ainsi de la reproductibilité du modèle. Cette solution nous a servi de référence (en absence de plantes médicinales). Le modèle a été utilisé dans les mêmes conditions, pour les tests correspondant à l'ajout de différents extraits de plantes

médicinales, aux concentrations suivantes : (0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 1) g/L. Pour chacune des concentrations des différents extraits de chaque plante, le test a été répété six fois et le coefficient de variation était, à chaque fois, inférieur à 10%. Les plantes médicinales testées dans ce modèle sont : *Phoenix dactylifera L* (noyaux de dattes), *Trigonella foenum* (fenugrec), *Malus pumila* (pelures de pommes), *Rubia tinctorum* (racines de garance) et *Cerasus vulgaris* (queues de cerises).

L'effet de l'apport des plantes médicinales sur le risque lithogène, repose sur la détermination des paramètres conductimétriques, notamment le pourcentage d'inhibition et leur comparaison avec ceux de la référence (en absence de plantes).

Les pourcentages d'inhibition obtenus, en passant d'une plante à une autre aux différentes concentrations en extraits aqueux, montrent que l'action de toutes les plantes dépend de la concentration de l'extrait aqueux, par conséquent le dosage de l'infusion doit être pris en compte dans les recommandations et les indications de ces dernières. Il apparaît aussi que l'extrait concentré (1g/L) de noyaux de *Phoenix dactylifera L* et de *Trigonella foenum* inhibe fortement la formation de la brushite. Le pouvoir inhibiteur du *Trigonella foenum* augmente lorsque la concentration de la plante augmente. Quant à l'extrait de *Malus pumila* à 0.125g/L, le pourcentage d'inhibition a été le plus élevé (~ 77%) de toutes les séries de plantes testées. Les extraits de *Cerasus vulgaris* inhibent modérément la cristallisation de la brushite et cela à toutes les concentrations testées. Toutefois, l'inhibition diminue lorsque la concentration de l'infusion de la plante augmente. La plante *Rubia tinctorum* inhibe fortement la cristallisation de la brushite à presque toutes les concentrations testées, mais à la concentration de 0.25g/L l'inhibition devient modérée.

Quant aux valeurs du pH du milieu aqueux, elles restent dans l'intervalle de précipitation de la brushite (soit de 5,7 (pH initial) à 6,2 (pH final)). En effet, la brushite se forme dans un milieu relativement plus acides (pH moyen= 6,35) que les autres phosphates, même si elle peut les accompagner à des pH parfois élevés.

Nous avons identifié la brushite comme espèce prédominante (majoritaire) à la fin de toutes les cristallisations (en absence et en présence des plantes médicinales). D'autres apatites telles que la carapatite et le PACC ont accompagné la brushite. L'identification des espèces cristallisées a été vérifiée par des méthodes physiques

d'analyse : Microscopie Electronique A Balayage (MEB), diffraction aux rayons X, (DRX) et Infra rouge à Transformée de Fourier (IRTF).

Comme deuxième modèle, nous avons choisi d'étudier la cristallisation de la brushite dans l'urine totale, des 24h, d'un sujet sain sans antécédent lithiasique, en induisant une hyperphosphaturie, par cristallisation de brushite. Cette cristallisation a été réalisée en absence et en présence des extraits aqueux de plantes médicinales aux concentrations suivantes : (0.0625 ; 0.125 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 et 40)g/L.

Les plantes testées dans ce modèle sont : *Phoenix dactylifera L* (noyaux de dattes), *Trigonella foenum* (fenugrec), *Malus pumila* (pelures de pommes), *Rubia tinctorum* (racines de garance) , *Cerasus vulgaris* (queues de cerises) et *Hordeum vulgare* (orge). La caractérisation des cristaux obtenus en fin de cristallisation, a été faite par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). La distinction des différentes apatites formées, a été réalisée par spectroscopie infrarouge (IRTF). L'effet de l'apport de plantes médicinales sur le risque lithogène a été évalué par comparaison entre la nature et les faciès des espèces phosphatiques cristallisées en présence de plantes médicinales ainsi que leur taille, leur abondance et leur agrégation, par rapport à l'échantillon de référence (en absence de plantes). Nous avons aussi pris en considération, dans tous les essais, l'évolution spontanée du pH urinaire.

Issu des résultats obtenus, il apparait que presque dans tous les cas de cristallisation, l'action de toutes les plantes dépend de la concentration de l'extrait aqueux. Cela confirme nos observations obtenues dans le modèle aqueux.

Il apparait que les extraits aqueux de *Malus pumila*, inhibent fortement la cristallisation de la brushite mais en faveur de celle du phosphate calcique carbonaté (carbapatite). L'action de la plante semble être élevée et le pH ne semble pas être le facteur dominant qui influence la cristallisation de ces phosphates calciques.

Quant aux extraits aqueux de *Phoenix dactylifera L* aux concentrations élevées (0,5 et 1) g/L, la cristallisation de la brushite évolue vers celle de la carbapatite, et une cristallisation hétérogène entre brushite et carbapatite est observée. L'agrégation, l'abondance, ainsi que la taille cristalline de la brushite sont nettement réduites.

Par contre, l'action de l'extrait des noyaux de *Phoenix dactylifera L* à 40 g/L réduit efficacement la cristallisation de la brushite.

Les observations par MEB nous ont permis d'apprécier aussi, un effet inhibiteur important des extrait aqueux de racine de *Rubia tinctorum* (garance) vis-à-vis de la cristallisation de la brushite. En effet, à la concentration la plus élevée de l'extrait (40g/L) la cristallisation de la brushite est efficacement réduite, ce qui corrobore les indications de la plante, en faveur de vertus antilithiasiques.

Les graines d' *Hordeum vulgare*, inhibe la précipitation de la brushite tout en induisant fortement celle de la carbapatite. Une autre observation très intéressante pour la phytothérapie est que la plante *Hordeum vulgare* induit aussi la cristallisation de l'oxalate de calcium dihydraté (wedellite). A la lumière de ces observations, *Hordeum vulgare*, ne devrait pas être préconisée dans le traitement prophylactique de la lithiase calcique puisqu'aux fortes concentrations, elle favorise l'agrégation de la brushite et de la wedellite et par conséquent l'augmentation du risque lithogène.

Alors qu'en présence de *Trigonella foenum*, la conversion de la brushite en phosphate amorphe carbonaté calcique (PACC) et en carbapatite (formes plus stables) , à pH>7, a été observée. La brushite a été observée comme espèce secondaire dans le milieu. Aux concentrations (0,5 et 1)g/L de fenugrec, la taille des cristaux de brushite et l'agrégation ont nettement diminué, ce qui témoigne de l'action inhibitrice modérée de la plante à forte concentration vis-à-vis de toutes les étapes de la cristallisation (nucléation, croissance et agrégation) de la brushite.

Quant aux racines de garance *Rubia tinctorum*, elles semblent posséder un potentiel inhibiteur très important vis-à-vis de la brushite mais à moindre degré vis à vis des apatites. Nous avons pu apprécier un effet inhibiteur de cette plante vis-à-vis de la cristallisation de la brushite, à partir de 0,25g/L de fenugrec. A la concentration la plus élevée de l'extrait (40g/L) la cristallisation de la brushite est efficacement réduite. Ainsi les racines de *Rubia tinctorum* semblent posséder des vertus antilithiasiques en prévenant le risque de formation des calculs urinaires de brushite et d'apatite ainsi que leur récurrence.

Cependant, il faut rappeler que certaines plantes possédant des vertus thérapeutiques, peuvent aussi être toxiques à fortes concentrations ou lorsqu'elles sont mal dosées et qu'il convient d'être prudent et vigilant quant à leur usage qui nécessite l'avis de tradipraticiens.

Au terme de la présente étude, il apparaît que l'effet des plantes médicinales sur le risque lithogène phosphocalcique repose sur un croisement de facteurs : le choix et les propriétés de la plante, le dosage de l'infusion, le mode nutritionnel et le pH urinaire du sujet lithiasique, qui semblent être importants en phytothérapie.

*L*es observations obtenues dans de telles approches expérimentales peuvent orienter les investigations cliniques vers des évaluations pertinentes, in vivo. En effet, il serait très important de tester ces extraits de plantes médicinales dans un modèle in vivo pour affirmer et appuyer ces vertus qui peut être d'un intérêt fondamental pour la phytothérapie, ou à l'inverse montrer les contre-indications liées aux plantes inductrices de cristallisation des espèces lithogènes telle que la brushite. Ces investigations apporteront des éléments pratiques, afin de déterminer la dose optimale pour une efficacité clinique optimisée.



Références bibliographiques



Références bibliographiques

- Abdel-Barry JA ; Abdel-Hassan IA ; Jawad AM ; Al-Hakiem MH. 2000. Hypoglycaemic effect of aqueous extract of the leaves of *Trigonella-foenum-graecum* in healthy volunteers. Eastern Mediterranean Health Journal. Vol 6. N 1. 83- 88.
- Abdelmalek F; Harrache D; Addou A ; Taleb S; Semmoud A; Addou A.2001. Etude par turbidimétrie, de la cristallisation oxalocalcique. *Physical & Chemical News* 4. 96-107.
- Acharya SN ; Acharya K ; Paul S ; Basu K. 2010. Antioxidant and antileukmic proprieties of selcted Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Genotypes grown in western canada. *Can. J. Plant Sci.* Vol 91. 99- 105.
- Achoura A ; Belhamra M. 2010. Aperçu sur la faune arthropodologique des palmeraies d'El-Kantara. *Courrier du Savoir.* 10. 93-101.
- Ali Alsarhan. 2013. Effet antibactérien des extraits des racines de garance. *European Scientific Journal.* Vol 9. N 15. 241-254.
- Amar A ; Harrache D, Atmani F ; Bassou G ; Grillon F.2010. Effet de *Parietaria officinalis* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium, dans l'urine. *Phytothérapie.* Vol 8. 342-347.
- Antonia Costa-Bauza, Catalina Barcelo, Juan Perello, Felix Grases. 2002. Synergism between the brushite and hydroxyapatite urinary crystallization inhibitors. *International Urology and Nephrology* 34. 447-451.
- Ayfer G ; Gorkcen Y ; Hikmet K. 2009. Antimicrobial effect of natural dyes on some pathogenic bacteria. *African Journal of Biothchnology.* Vol 8. N 2. 291-293.
- Bahri Fouad. Etude in vitro de l'effet des eaux thermales et du thé vert de chine sur les cristaux urinaires. Thèse de doctorat en biologie. 2005.
- Beghalia M, Hocine Allali, Saïd Ghalem, Aissa Belouatek, Abdelhamid Sari. 2011. Molecular Modeling of Chemicals Products Inhibitors of Growth Struvite Crystal. *Advances in Molecular Imaging.* 1. 33-42.
- Beghalia M; Belouatek A; Ghalem S and Allali H. 2014. Inhibition and Dissolution Crystals of Magnesium Ammonium Phosphate by *Acacia Radiana* (Bark) and (Sheet) in Vitro Study. *Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg. (IJAAEE)* Vol. 1. 46- 50.
- Ben Aïm Roger L. 2001. L'indispensable en Electrochimie. Bréal.
- Bensekrane B; Gallart Mateu D ; De la Guardia M ; Harrache D. 2015. Effets des extraits de noyaux de dattes *Phoenix dactylifera L* sur la cristallisation de la brushite, dans l'urine totale. *Phytothérapie.* Springer-varlags. 1-12.
- Berland Y et Omer M. 1991. Mécanismes physiquo chimiques de la formation des calculs. *Rev. Prat.* 41.21. 332-338.
- Berland Y ; Olmer M ; Boistelle R ; Barlatier A. 1984. Influence respective du calcium et de l'oxalate sur la cristallisation des oxalates de calcium dans l'urine. *Néphrologie.* 5. 175- 179.
- Berthod A ; Billardelle B ; Geoffroy S. 1999. Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation1. *Analisis.* EDP Sciences. Wiley-VCH. 27. 750- 757.
- Bertrand Doré. 2004. Les lithiases rénales. Livre. Springer- Verlag. France, Paris.
- Bezanger-Beauquesne ; M Pinkas ; M Tork ; F Trotin. 1990. Plantes médicinales des régions tempérées Maloine. Paris.
- Boistelle R ; Berland Y. 1992. Lithogénèse. Editions Techniques-Encycl. Med. Chir. (Paris France), Néphrologie-Urologie, 18104 A²⁰, 8p.

- Brandi G ; Nakada SY ; Penniston KL. 2008. Practical approach to metabolic evaluation and treatment of the recurrent stone patient. *WMJ*. 107, 2. 91-100.
- Bresleau NA ; Pak CYC. 1986. Urinary saturation, heterogeneous nucleation and crystallization inhibitors in nephrolithiasis. *Nephrolithiasis . Urol Int*. 41. 418-421.
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} Ed Tec & Doc. Paris.
- Cardon D ; Du Chalenet G. 1990. Le guide des teintures naturelles. Delachaux et Niestlé. Neuchâtel. Paris.
- Chaudhary A ; Singla SK ; Tandon C. 2010. In vitro Evaluation of Terminalia arjuna on calcium phosphate and calcium oxalate crystallization. *Indian J of Pharm. Sci*. Vol 72. N 3. 340- 345.
- Chauhan C K ; Joshi MJ ; Vaidya ADB. 2011. Growth inhibition of struvite crystals by the aqueous root extract of *Rotula aquatica*. *Indian Journal of Biochemistry et Biophysics*. Vol 48. 202207.
- Chauhan CK ; Joshi MJ ; Vaidya ADB. 2008(b). Growth inhibition of struvite crystals in the presence of Herbal extract *Commiphora wightii*. *J. Mater Sci. Mater Med*. 3489.
- Chauhan CK ; Joshi MJ ; Vaidya ADB. 2009. Growth inhibition of struvite crystals in the presence of herbal extract *Boerhaavia diffusa* linn. *American Journal of Infections Diseases*. 5(3). 170- 179.
- Chauhan CK ; Joshi MJ. 2008(a). Growth inhibition of struvite crystals in the presence of juice of *Citrus medica* Linn. *Urol. Res*. 154.
- COE FL ; Lawton RL ; Goldstein RB ; Tembe V. 1980. Uricacid saturation in calcium nephrolithiasis. *Kidney Int*.17. 662- 668.
- Cotton F ; Wolff I. Sinon ; Idrissi M ; Pozdzik A. 2014. Apport de la biologie chimique dans l'exploration étiologique et le suivi de l'urolithiase. *Rev Med Brux*. 35. 243- 9.
- Coury Lou. 1999. Current Separation. Bioanalytical Systemes. Inc. 91- 96.
- Cristina Oliveira ; Petia Georgieva ; Fernando Rocha ; Antonio Ferreira. 2007. Dynamical model of brushite precipitation. *Crystal Growth*. 305. 201-210.
- Daniel Cachau- Herreilat. 2009. Des expériences de la famille acide-base : Réussir, exploiter et commenter 50 manipulation de chimie. Groupe de Boeck s,a.
- Daudon M ; Bazin D. 2007. Lithiase rénale : de la nature du calcul à la cause de la maladie lithiasique. *Les rencontres de Saint Alban*.
- Daudon M ; Bouzidi H ; Bazin D. 2010. Composition and morphology of phosphate stones and their relation with étiology. *Urol Res*. 38. 459- 467.
- Daudon M ; Cohen-solal F ; Jungers P. 2000. Mécanisme de la lithogénèse et de la cristallurie. *Biologie & Santé*. Vol 1. N 1. 50- 65.
- Daudon M ; Hennequin C ; Badre C ; Jungers P ; Lacour B ; Druket T. 1994. inhibiteurs de cristallisation dans l'urine. *Flammarion Médecine-sciences-actualités néphrologiques*. 165-220.
- Daudon M ; Jungers P ; Lacour B. 2004. Intérêt clinique de l'étude de la cristallurie. *Annale Biol Clin*. Vol 62. N 4. 379- 393
- Daudon M ; Jungers P. 2001. Epidémiologie de la lithiase urinaire. *Euro biologiste*. 253. 5-15.
- Daudon M ; Traxer O ; Lechevallier E ; Saussine C. 2008. Lithogénèse urinaire. *Progrès en Urologie*. Vol 18. 815-827.

- Daudon M. 1989. Méthodes d'analyse des calculs urinaires et des cristaux urinaires. Classification morpho-constitutionnelles des calculs. In : Jungers P ; Leduc A. lithiase urinaire. Paris Flammarion Médecines-Sciences. 35-113.
- Daudon M. 1993. Critères d'interprétations d'une cristallurie. Eurobiologiste. Tome 27. N 203.
- Daudon M. 2003. Caractéristique biologique et signification clinique de la cristallurie. Laboratoire CRISTAL. Site internet :<http://www.centre-evian.com/fondDoc/index-cristal.html?contenu-cristal.html>.
- Daudon M. 2005. Epidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. Annales d'Urologie. Vol 39. N 6. 209-231.
- Daudon Michel. 2007. Pourquoi et comment analyser un calcul urinaire ? Avis d'expert. EMC.
- Daudon Michel; Traxer Olivier ; Jungers Paul. 2012. Lithiase urinaire, 2^{ème} édition. Médecine Sciences. Lavoisier.
- Debuigne Gérard. 1974. Dictionnaire des plantes qui guérissent. Librairie Larousse. Paris. 130
- Delaney B ; Nicolosi RJ ; Wilson TA ; Carlson T ; Frazer S ; Zheng GH ; Hess R ; Ostergren K ; Haworth J ; and Knutson N. 2003. Beta-glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. J Nutr. 133 (2). 468- 475.
- Delvasto P ; Valverde A ; Ballester A ; Igual JM ; Munoz JA ; Gonzalez F ; Blazquez ML ; Garcia C. 2006. Characterization of brushite as a re-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. Soil Biology & Biochemistry. 38. 2645-2654.
- Diana KJ ; George KV. 2012. In vitro studies on antilithiasic property of *Achyranthes aspera* L. rar *aspera*. Hook. F. Journal of Pharmacy Research. Vol 5. 8. 4366- 4370.
- Djaroud S ; Harrache D ; Amar A. 2012. Effet in vitro de l'orge *Hordeum Vulgare* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium monohydraté (whewellite). Ann Biol Clin. 70. 725-31.
- Djaroud S, Harrache D. (2013). Étude de l'effet d'*Hordeum vulgare* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium dans l'urine. *Phytothérapie* 2013. 11(5) : 289-293.
- Djaroud Samira. 2013. Evaluation de l'action de plantes médicinales sur la lithogénèse oxalocalcique : intérêt pour la phytothérapie. Thèse de Doctorat En Chimie. Université Djillali Liabes. Sidi Bel Abbes.
- Doddametkurke Ramegowda Basavaraj ; Chandra Slekhar Biyani ; Anthony J Browning ; Jon J Carthedge. 2007. The role of urinary kidney Stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. European Association of Urology. 126- 136.
- Fallahi Taqseft Saad. 2011. Bilan de la lithiase urinaire des recommandations à la mise en œuvre au CHU Hassan II. Thèse de Doctorat en Medecine. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Maroc.
- Ferreira A ; Oliveira C ; Rocha F. 2003. The different phases in the precipitation of dicacium phosphate dihydrate. Crystal Growth. 252. 599-611.
- Fleurentin J. 1991. Les plantes médicinales de la pharmacopée française. Encyclopédie des médecines Naturelles (phytothérapie Aromathérapie). Paris. Ed Technique.10.
- Gahlaut A ; Pawar SD ; Mandal TK ; Dabur R. 2012. Evaluation of clinical efficacy of *Bryophyllum Pinnatum* Salisb for treatment of lithiasis. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 4. Issue 4. 505- 507.

- Gambaro G ; Cicerello E ; Marzaro G. 1986. A critical evaluation of the urinary inhibiting activity in nephrolithiasis. *Urol In.* 41. 418-421.
- Gehan Khalaf and Abdel-Gabbar Mohamed. 2008. Effect of barley (*Hordeum vulgare*) on the liver of Diabetic rats histological and biochemical study. *Egypt. J. Histol.* Vol 31. N 2. 245-255.
- George K Varghese ; Diana KJ ; Solomon Habtemariam. 2014. In vitro Studies on Indigenous Medicine for Urolithiasis : Efficacy of Aqueous Extract of *Aerva lanata* (Linn) Juss. Ex Schult on Growth Inhibition of Calcium Hydrogen Phosphate Dihydrate. *The Pharma Innovation journal.* Vol 3. N 1. 92-100.
- Goyal Parveen Kumar ; Mittal Arun ; Kumar Rishi. 2011. Evaluation of *Tinospora cordifolia* for Antiurolithiatic Potential. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS).* Vol 9. Issue 9.
- Grégoire Chevreau ; Jocelyne Troccaz ; Pierre Conort ; Raphaëlle Renard-Penna ; Alain Mallet ; Michel Daudon ; Pierre Mozer. 2009. Estimation of urinary stone composition by automated processing of CT images. *Urol Res.* Springer-verlag. 37. 241-245.
- Haddad JJ ; Ghadieh RM ; Hassan HA ; Nakhil YK ; Hanbali LB. 2013. Measurements of antioxidant activity and antioxidant compounds under versatife extraction conditions. *Antiinflammation Antiallergy Agents Med Chem.* Vol 12. N3. 229- 245.
- Hale AC. 2003. Screening potato genotypes for antioxydant Activity. Identification of the responsible componds and differentiating russet norhotach strains using. AFLP and Microstatellite Harker Analysis Office of Graduate Studies of Texas A & M University Genetics. 260.
- Haleh Mokabber ; Mehrangiz Sadooghi ; Mohamed Bagher Minaee. 2013. Effect of *Hordeum vulgare* L on cerebellum cortex development indiabetic Albino mice fetal. *International Journal of Farming and Allied Sciences (IJFAS).* Vol 2. N 19. 775-778.
- Hamilton A. 2003. Medicinal plants and conservation : issues and approachs. Surrey. International plants conservation Unit. WWF-UK. 51.
- Hanbali Lama B ; Almor Raya S ; Bou Teen Diana R ; Ghadieh Rana M ; Hasan Hiba A ; Nakhil Yasmine K ; Haddad JJ. 2013. The antimicrobial activity of red sour cherry gram-positive and gram-negative bacteria and *C albicans* in culture. *Current Nutrition & Food Sciences.* 9.3.217.232.
- Hannache B ; Bazin D ; Boutefnouchet A ; Daudon M. 2012. Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro : étude à l'échelle mésoscopique. Elsevier Masson SAS. 22. 577-582.
- Harbone JB et Baxter H. 1993. Handbook of bioactive componds from plants, phytochemical dictionary. Edition Taylor et Francis. P 449.
- Harbone JB et Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55. 481- 504.
- Harchane H ; El Addas H ; Amsaguine S ; El Amrani N ; Radallah D. 2012. Effects de l'extrait aqueux des graines du fenugrec (*trigonella foenum*) sur l'amélioration du profil lipidique et la prise de poids chez le rat. *Phytothérapie.* Springer-verlag. France. 0738-6.
- Harrache D ; Mesri Z ; Addou A ; Semmoud A ; Lacour B ; Daudon M. 1997. La lithiase urinaire chez l'enfant dans l'Ouest algérien. *Ann Urol.* Vol 31. N 2. 84-88.
- Harrache D ; Mesri Z ; Addou A ; Semmoud A ; Lacour B ; Daudon M. 1997. Analyse des calculs urinaires dans l'ouest Algérien, par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. *L'Eurobiologiste.* Tome XXXI. N 228.

- Harrache Djamilia. 1999. Etude spectroscopique et inhibitrice de la lithiase urinaire dans l'ouest Algérien. Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie. Université Djillali Liabes. Sidi Bel Abbès.
- Hawatson G ; Bell PG ; Tallent J ; Middleton B ; McHugh MP ; Ellis J. 2012. Effect of tart cherry juice (*Prunus cerasus*) on melatonin levels and enhanced sleep quality. *Eur. J. Nutr.* 51. 8. 909-16.
- Hemingway RW. 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In *L part polyphénols : synthesis, proprieties, significaside*. Loks. P. E. New york.
- Hennequin C ; Lacour B ; Daudon M. 1993. Les inhibiteurs de cristallisation. *Eurobiologiste*. 203. 47-55.
- Hennequin C ; Lalanne V ; Daudon M ; Lacour B ; Druke TA. 1993. A new approach to study inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *Urol. Res.* 21. 101-108.
- Herbert Fleisch. 1978. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney International*. Vol 13. 361-371.
- Hesse A ; Heimbach D. 1999. Causes of phosphate stone formation and the important of metaphylaxis by urinary acicification : a review. *World J Urol*. Springer-Verlag. 17. 308- 315.
- Heughebaert J C. 1984. Relations entre les phosphates de calcium et les oxalates de calcium des calculs urinaires. *Néphrologie*. 5. 163-170.
- Hong N Lim ; Anuar Kassim ; Nay M Huang ; Chin H chia. 2010. Microstructure of brushite crystals prepared via high internal phase emulsion. *Centre European Journal of Chemistry*. 8 (1). 202-206.
- Hoonman N ; Mojab F ; Nickavar B ; Pouryousefi-Kermani P. 2009. Diurétique effect of powdered *cerasus avium* (cherry) tails on healthy volunteers. *Pak J Pharm Sci.* 22 (4). 381- 3.
- Hopkins G.V et E vrard C.M. 2003. *Physiologie végétale*. The Boeck université ed. 532.
- Hubert H. Givault. 2007. *Electrochimie physique et analytique*. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Inge Hojgaard ; Anne-Marie Fornander ; Mari-Anne Nilsson ; Hans Goran Tiselius. 1999. The Effect Of Ph Changes On Crystallization Of Calcium Salts In Solution With Anion Composition Corresponding To That In The Distaltubule. *Scanning Microscopy*. Vol 13, N2-3, 235-245.
- Iserin Paul. 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales*. Ed Larousse-Bordas. Paris.14.
- Iyad Ahmed Abboud. 2008. Mineralogy and chemistry of urinary stones : patients from North Jordan. *Environ Geochem Health*. Vol 30. 445-463.
- Jean- Francis Marucco. 2004. *Chimie de solides*. EDP Sciences.
- Jean-François Bastien. 1802. *Dictionnaire botanique et pharmaceutique*. Paris. Page 252.
- John D Sallis ; Nathan FG Parry ; John D Meehan ; Harold Kamperman ; Maree E Anderson. 1995. Controlling influence of phosphocitrate in vitro and in vivo on calcium oxalate crystal formation and growth. *Scanning Microscopy*. Vol 9. N 1. 127-136.
- Joshi VS ; Parekh BB ; Joshi MJ ; Valdyia AB. 2005. Herbal extracts of *Tribulus terrestris* and *Berginia ligulata* inhibit growthof calcium oxalate monohydrate crystals in vitro. *Journal of Crystal Growth*. Vol 275. N 1-2. 1403- 1408.
- Jungers P ; Daudon M ; Conort P. 1999. *Lithiase rénale. Diagnostic et traitement*. Flammarion. Médecines-Sciences. Paris. 256.
- Jungers P ; Daudon M ; Leduc A. 1989. *Lithiase urinaire*. Flammarion Médecine-sciences. 114-157.

- Kaid Omar Z ; Daudon M ; Attar A ; Semmoud A ; Lacour B ; Addou A. 1999. Corrélation entre cristalluries et composition des calculs. Progrès en Urologie. Vol 9. 633-641.
- Kalyoncu F ; Cetin B ; Seglam H. 2006. Antimicrobial activity of common Madder (*Rubia tinctorum* L). *Phytother Res.* 20. 6.490-2.
- Kanauchi O ; Iwanaga T and Mitsuyama K. 2001. Germinated barley foodstuff feeding. A novel nutraceutical therapeutic strategy for ulcerative colitis. *Digestion.* 63. 1. 60-67.
- Kansole M.M.R. 2009. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *lucas martinicensis*. *Jacquis.*
- Karim A ; Mekhfi H ; Ziyat A. 2010. Anti-diarrhoeal activity of crude aqueous extract of *Rubia tinctorum* L roots in rodents. *J Smooth Muscle Res.* 46. 2. 119-23.
- Kebler T ; Jansen B ; Hesse A. 2002. Effect of blackcurrant, cranberry and plum juice consumption on risk factors associated with kidney stone formation. *European Journal of Clinical Nutrition.* 56. 1020- 1023.
- Kelley DS ; Rasooly R ; Jacob RA ; Kader AA ; Mackey BE. 2006. Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J Nutr.* 136. 4. 981-6.
- Khan SY ; Seeram NP ; Nair MG ; Bourquin LD. 2003. Tart cherry anthocyanin inhibit tumor development in APC (Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 194. 1. 13-9.
- Kumar Mukesh ; Jing Xie ; Krishnan Chittur ; Chyde Riley. 1999. Transformation of modified brushite to hydroxyapatite in aqueous solution : effects of potassium substitution. *Biomatériaux.* 20. 1389- 1399.
- Laquatra I. 1999. Les plantes médicinales : traitements ou causes de maladie. Documentation. Institut de nutrition pour bébés. Vol.16. 1.
- Larousse. 2001. Encyclopédie des plantes médicinales, préparation, soins. 28- 31.
- Larrey D. 1997. Hepatotoxicity of herbal remedies. *J Hepatol.* 26 [suppl.1]. 47- 51.
- Larrey D. 2002. Hepatotoxicity of herbal remedies. *J Hepatol.* 26. 47- 51.
- Lartigau- Roussin C. 2002. Médecine traditionnelle à Mayotte. *Bull bad-Hist & Géo Mayotte.* N6.19.
- Ligabue A ; Fini M ; Robertson WG. 1979. Influence of urine on « in vitro » crystallization rate of calcium oxalate : determination of inhibitory activity by a (C¹⁴) oxalate technique. *Clin. Chim. Acta.* 98. 39-46.
- Lim H N ; Kassim A ; Huang N M ; Yarmo M A ; Khiew P S ; Chiu W S. 2009. Preparation and Characterization of Brushite Crystals Using High Internal Phase Emulsion. *Colloid Journal.* Vol 71. N 6. 793-802.
- Lugaçi A ; Hovari J ; Sagi KV ; Biro L. 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis.* 47 (1-4). 119- 125.
- Luman De ; Lunasin BO. 2005. A cancer –preventive soy peptide. *Nutr Rev.* Vol 63. N 1. 16- 21.
- Manish A Patel ; Paras K Patel ; Dr Avinash K Seth. 2011. Inhibition Of Calcium Oxalate Crystallization By The Fruit Extracts Of *Piper longum* L. *pharmacologyonline.* 2. 1169-1177.
- Manjula K ; Pazhanichamy K ; Kumaran S ; Evera T ; Dale keefe C ; Rajendran K. 2012. Growth characterization of calcium oxalate monohydrate crystals influenced by *Costus igneus* aqueous stem extract. *Int.J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol 4. N 1. 261- 270.

- Marangella M ; Daniele P.G ; Ronzani M ; Sonego S ; Linari F. 1985. Urine saturation with calcium salts in normal subjects and idiopathic calcium ston-formers estimated by an improved computer model system. *Urol Res.* 13. 189- 193.
- Marucco Jean-Francis. 2004. *Chimie des solides.* EDP Sciences.
- Mary Omwamba ; Feng Li ; Guiju Sun ; Qihui Hu. 2013. Antioxidant effect of Roasted Barley (*Hordeum vulgare* L) grain extract towards oxidative stress in vitro and in vivo. *Scientific Research.* Vol4. N8A. 139- 146.
- Masawaki T ; Taya M ; Tone S. 1996. Selective solvent extraction of ruberythric acid from madder roots and subsequent hydrolysis with B-glucosidase. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 81. 567-569.
- Maurice Nicole. 1997. De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie Moléculaire du XXIe siècle. Ed Lavoisier. Paris.12-14.
- Maydani M. 2000. Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients. *Nutr Rev.* 58. 278- 281.
- Meddleton E ; Kardasani J.C. 1993. The flavonoïdes advances in : research since 1986. JB Harbone Chapmon and Hall. London. 617- 652.
- Medic Sanic M ; Jasprica I, Smolcic Bubalo A, Mornar A. 2004. Optimization of chromatographic conditions in this layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatia Chemica Act.* 361- 366.
- Meiouet F ; El Kabbaj S ; Daudon M. 2011. Etude in vitro de l'activité litholytique de quatre plantes médicinales vis-à-vis des calculs urinaires de cystine. Elsevier Masson France. *Progrès en urologie.* 21. 40-47.
- Mia Mantynes. 2001. Temperature correction coefficient of electrical conductivity and of density measurements for saline ground water. Working Report.
- Mia Mantynes. 2001. Temperature correction coefficients of électrique conductivity and of density measurements for saline ground water.
- Minaiyan M ; Ghannadi A ; Movahedian A, Hakim-Elali I. 2014. Effect of *Hordeum vulgare* L (Barley) on blood glucose levels of normal and STZ-induced diabetic rats. *Pub Med. Res Pharm Sci.* Vol 9. N3. 173-8.
- Mohamed Beghalia ; Hocine Allali ; Saïd Ghalem ; Aïssa Belouatek ; Abdehamid Sari. 2011. Molecular Modeling of Chemicals Products Inhibitors of Growth Struvite Crystal. *Advanced in Molecular Imaging. Scientific Research.* 1. 33-42.
- Monika Gupta ; Seema Bhayana ; Sikka SK. 2011. Role of Urinary inhibitors and promoters in Calcium oxalate crystallization. *International Journal of Research in Pharmacy and chemistry.* 1(4). 793-798.
- Montastruc L ; Azzaro-Patel C ; Biscans B ; Cabassud M ; Domenech S. 2003. A Thermochemical approach for calcium phosphate precipitation modeling in a pellet reactor. *Biochemical Engineering Journal.* Vol 94. N1. 41-50.
- Munoz Martinez JA. 2004. Lithiasis renal oxalocalcica : Avances en la comprensión de su etiologica y mejoras en metodologia analitica para su estudio. Thèse de doctorat. Université de Barcelone.
- Newman DJ ; Price CP. 2005. Renal function and nitrogen metabolites. Mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité. *Ann Biol Clin. Quebec.* Vol 42. 3. Pp 29.
- Nguyen QD ; Daudon M. 1997. Infrared and Raman Spectra of Calculi. Edition Scientifique et Médicale Elsevier.

- Odounga Karen Flora. 2011. *Rubia tinctorum* L (El foua) plante médicinale potentiellement dangereuse : mise à jour bibliographique et analyse phytochimique d'échantillons Marocains. Thèse du Doctorat en pharmacie. Université Mohamed V. Maroc.
- Oliveira C ; Ferreira A ; Rocha F. 2007. DICALCIUM PHOSPHATE DIHYDRATE PRECIPITATION Characterization and Crystal Growth. *ICChemE*. Vol 85 (A12). 1655-1661.
- Oliveira C, Ferreira A, Rocha F. 2007. Dicalcium phosphate dihydrate précipitation characterization and crystal growth. *Institution of chemical Engineers*. Vol 85 (A12) 1655-1661.
- OMS. 2003. Médecine traditionnelle, aide mémoire n° 134. Règlements des médicaments à base de plantes. Genève. WHO/TRM/98.1.
- Oussama A ; Zaïber KF ; Mernari B ; Hilmi A ; Semmoud A ; Daudon M. 2000. Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans le moyen atlas marocain par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. *Prog. Urol*. Vol 10. 404- 410.
- Pac CYC ; Hayashi Y ; Finlayson B ; Chu S. 1977. Estimation of the state of saturation of brushite and calcium oxalate in urine : a comparison of three methods. *J Lab Clin Med*. 89. 891-901.
- Pac CYC ; Holt K ; Zerwekh JE. 1979. Attenuation by monosodium urate of the inhibitory effect of glycosaminoglycans on the calcium oxalate nucleation. *Invest Urol*. 17. 138-140.
- Pageaux G ; Larrey D. 2003. *Alternativemedicine, vitamins and natural hepatocins*. In *Drug. Induced liver disease*. Kaplowitz N and Deleve LD. Eds. Marcel Dekker. New York. Basel.
- Pak Charles Y.C. 1969. Physicochemical Basis for Formation of Renal Stones of Calcium Phosphate Origin : Calculation of the Degree of Saturation of Urine With Respect to Brushite. *Clinical Investigation*. Vol 48.
- Pak Charles YC ; Ruskin Belle. 1970. Calcification of Collagen by Urine In Vitro : Dependence on the Degree of Saturation of Urine with Respect to Brushite. *the journal of Clinical Investigation*. Volume 49. 2353-2361.
- Pak CYC ; Holt K. 1976. Nucleation and growth of brushite and calcium oxalate in urine of stone-formed. *Metabolism*. 25. 665-673.
- Park SU ; kim YK ; Lee SY. 2009. Establishment of hairy root culture of *Rubia akane* Nakai for alizarin and purpurin production. *Sci Res Essay*. Vol 4. N2. 94-97.
- Paul Goetz ; Kamel Ghédira. 2012. *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer-, Paris.
- Peyrin-Biroulet L ; Barrand H ; Petit- Laurens F ; Ancel D ; Watelel J.Chone L ; Hudziak H ; Bigard MA ; Bronnowicki J.P. 2004. Hépatotoxicité de la phytothérapie : Données cliniques, biologiques et mécanismes en cause pour quelques exemples caractéristiques. *Gastroenterol. Chin Biol*. 28. 540-50.
- Poppitt S D. 2007. Soluble fibre oat and barley beta-glucan enriched products : can we predict cholesterol-lowering effect ?. *Br J Nutr*. 97(6). 1049-1450.
- Randall A. 1936. An hypothesis for the origin of renal calculus. *New Engl JMed*. 214. 234-237.
- Rao TVRK ; Sofia Bano. 2003. Clinicobiochemical indexing of calcium urolithiasis on the basis of urinary citrate to calcium ratio and inhibition of mineralisation of urinary stone forming minerals by human urine. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 18 (1). 52-60.
- Rath G ; Ndonzoa M ; Hostetlman K. 1995. Antitungal anthraquinone from *Morinda lucida*. *International Journal of Pharmacognosy*. 33. 107- 114.

- Richter D. 1936. Anthraquinone colouring matters : ruberythric acid. Journal of Chemical Society. 1701-1703.
- Roberto Mazzé. 2009. Growth of hydroxyapatite crystals from solutions with pH controlled by novel vapor diffusion techniques. Effects of temperature and of the acidic phosphoprotein osteopontin on crystals growth. An International journal of Mineralogy, crystallography, Geochemistry, ore deposits , Petrology Volcanology.78. 1. 19-43.
- Robertson W G ; Peacock M ; Nordin Bec. 1968. Activity product in stone forming and non – stone forming urine. Clin Sci. Vol 34. 579- 594.
- Robertson WG ; Peacock M ; Knowles CF. 1973. Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone-formers. In : Cifuentes Delatte L ; Rapado A ; Hodgkinson A. Urinary Calculi. Recent Advances in Actiology, stone Structure and Treatment. S Karger, Basel. 302-306.
- Robertson WG ; Peacock M ; Marshall RW. Marshall DH ; Nordin BEC. 1976. Saturation-Inhibition index as a mesure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. New Engl J : Med. 294. 249-252.
- Robertson WG ; Peacock M. 1972. Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone formers. Clin Sci. Vol 43. 499-506.
- Roch E. 2003. Stress oxydant micronutriments et santé : INRA-CRNH, unité des maladies métabolique et micronutriments. 63122 st geniés champarelle.
- Rouzière S ; Bazin D ; Daudon M. 2009. La brushite cache t-elle plusieurs entités pathologiques ? 14èmes Confrontations clinico-biologiques de l'hôpital Necker sur la lithiase urinaire. 22-23.
- Schppan D ; Jia JD ; Brinkhaus B ; Hahn EC. 1999. Herbal procutts for liver diseases : a therapeutic challenge for the new millennium. Hepatology. 30. 1099- 1104.
- Sekar C ; Suguna K. 2011. Effect of H₃PO₄ reactant and NaF additive on the crystallization and properties of brushite. ADVANCED MATERIALS letters. Vol 2(3). 227-232.
- Sekkoum K ; Cheriti A ; Taleb S ; Belboukhari N ; Djellouli H M. 2010. Inhibition Effect of Some Algerian Sahara Medicinal Plants on Calcium Oxalate Crystallization. Asian Journal of Chemistry. Vol 22. N 4. 2891-2897.
- Selen Mandel ; A. Cuneyt Tas. 2010. Brushite (CaHPO₄, 2H₂O) to octacalcium phosphate (Ca₈(HPO₄)₂(PO₄)₄.5H₂O) transformation in DMEM solution at 36,5C⁰. Materials Science and Engineering C.30. 245-254.
- Shanfzadeh M ; Ebadi N ; Manayi A ; Kamalinejad M ; Rezaeizadeh M; Mirabzadeh M ; Bonakdar Yazdi B ; Khanavi M. 2014.
- Shaylin Shadanbaz ; George J Dias. 2012. Calcium Phosphate Coatings on Magnesium alloys for Biomedical Applications : A review. Acta Biomaterialia. Vol 8. 20-30.
- St Pierre PDS. 1955. The préparation of diacalcium phosphate dihydrate and calcium pyrophosphate. J Am Chem Soci. 77. 2197-8.
- Stary F ; Storchova H ; Dubourg MJ. 1992. Plantes médicinales. 178-179.
- Stedman C. 2002. Herbal hepatotoxicity. Sem Liv Dis. 22. 195- 206.
- Suguna K ; Sekar C. 2011. Role of strontium on the crystallization of calcium hydrogen phosphate dihydrate (CHPD). Journal of Minerals and Materials characterization & Engineering. Vol 10. N 7. 625-636.
- Sujata Singh ; Vaishali Singh ; Saroj Aggarwal ; Uttam Kumar Mandal. 2010. Synthesis of brushite nanoparticles at different temperatures. Chemical Papers 64 (4). 491-498.

- Tang R ; Nancollas GH ; Giocondi JL ; Hoyer JR ; Orme CA. 2006. Dual roles of brushite crystals in calcium oxalate crystallization provide physicochemical mechanisms underlying renal stone formation. *Kidney international*. 70. 71-78.
- Thomas J ; Thomas E ; Tobelem G ; Economou E ; Arvis G. 1988. Lithiases urinaires. Société Générale des Eaux Minérales de Vittel.
- Thomas WC ; Howard JE. 1959. Studies on the mineralising propensity of urine from patients with and without renal calculi. *Trans Ass Am Phys*. 72. 181-187.
- Tuma J ; Hess B. 2001. Néphrolithiasis : épidémiologie, physiopathologie, collique néphrétique, imagerie, diagnostique. *Forum Med Suisse*. N 41. 1019- 1024.
- Vann A. 1998. The herbal medicine boom. Understanding what patients are taking cleveland clinic. *Journal of Medecine*. 65. 129- 134.
- Vansant G. 2004. Radicaux libres et antioxydants : principes de base Symposium Antioxydants et Alimentation. Institut Danone.
- Vigneu C. 1985. Plantes médicinales thérapeutiques- toxicité. Ed Masson. 222-224.
- Vimal S Joshi ; Bharat B Parekh ; Mihir J Joshi ; Ashok D B Vaidya. 2005. Inhibition of the growth of urinary calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals with aqueous extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata*. *Urol Res*. 33. 80-86.
- Warpehoski M.A ; Buscemi P.J ; Osborn D.C ; Finlayson B ; Goldberg E.P. 1981. Distribution of organic matrix in calcium oxalate renal calculi. *Calcif Tissue Int*. 33. 211- 222.
- Warpehoski MA ; Buscemi PJ ; Osborn DC ; Finlayson B ; Goldberg EP. 1981. Distribution of organic matrix in calcium oxalate renal calculi. *Calcif tissue Int*. 33. 211-222.
- Wichtl M ; Anton R. 2003. Plantes thérapeutiques. EMI/Tec et Doc. Paris. 216-9.
- Yogendr B ; Mohan Singh MR ; Vijay J ; Vikas G. 2009. Antilithiatic effect of flowers of *Jasminum Auriculatum* Vahl. *International Journal of Green Pharmacy*. Vol 3. 3155- 158.