



# La lithiase urinaire : épidémiologie, rôle des éléments traces et des plantes médicinales

Badreddine Hannache

► **To cite this version:**

Badreddine Hannache. La lithiase urinaire : épidémiologie, rôle des éléments traces et des plantes médicinales. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. <NNT : 2014PA114804>. <tel-01281306>

**HAL Id: tel-01281306**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01281306>**

Submitted on 2 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

## ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

## DISCIPLINE : PHYSIQUE

ANNÉE 2013 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1261

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 04/03/2014

par

**Badreddine HANNACHE**

La lithiase urinaire : Épidémiologie, rôle des éléments  
traces et des plantes médicinales

**Directeur de thèse :**  
**Co-directeur de thèse :**

Dominique BAZIN  
Michel DAUDON

Directeur de recherche CNRS, UPMC  
PH Biochimiste, Hôpital Tenon, UPMC

### **Composition du jury :**

*Président du jury :*  
*Rapporteurs :*

Antoine DURRBACH  
Bertrand DORE  
Emmanuel LETAVERNIER

PU-PH Urologue, Université Paris XI  
PU-PH Urologue, Université de Poitiers  
MC-PH Néphrologue, Hôpital Tenon

## REMERCIEMENTS

Je veux remercier DIEU pour m'avoir donné la force de tous les jours. A toute ma famille et étroitement mon cher père et mes proches pour m'avoir donné l'esprit pour continuer. A ma femme pour tout ce qu'elle a fait pour que je puisse atteindre notre but.

A Monsieur le Docteur Dominique Bazin pour sa patience, direction de ce travail, son soutien, les facilités qu'il m'a offertes pour dépasser les moments difficiles et surtout son caractère amicale.

A Monsieur le Docteur Michel Daudon pour m'avoir accueilli dans son laboratoire C.R.I.S.T.A.L et appris ce que je ne peux pas apprendre sans lui que ce soit la formation que j'ai faite sur l'interprétation des cristallurie ou les cours de DU sur la lithiase urinaire, toute son aide, ses conseils et la révision de cette thèse. Je remercie ainsi tous les techniciens et membres de ce labo qui m'ont facilité l'utilisation du matériel pendant leurs heures de travail.

Je voudrai remercier spécialement Abdelatif Boutefnouchet pour son aide de toujours et la révision de ce travail, sa collaboration effective et son caractère fraternel.

Je remercie ainsi les rapporteurs Messieurs Doré Bertrand, Letavernier Emmanuel et l'examineur Monsieur DURRBACH Antoine d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie les membres du Laboratoire de Physique des Solides (Orsay) et sur leur tête la directrice du Laboratoire Mme Dominique Chandesris ainsi que les chercheurs : Dr Jean-Paul Pouget, Dr Jean Doucet, Dr Fatma Briki, Dr Emelie, Dr Pascale Launois sans oublier le staff administratif et technique du Laboratoire : Jeril Degrouard, My-Anh Dang, Martine Delor, Sophie Tourlet, Raphaël Weil, Nadine Mehl, Véronique Thieulart, Sandrine Ermisse et très spécialement Amélie Lecchi et Stéphane Rouzière qui m'ont aidé beaucoup à réaliser mes manips.

Je remercie pareillement l'équipe de Saclay CEA et précisément Eddy Foy, et les équipes de LBB et Soleil pour leurs contributions.

Je remercie également les membres administratifs de l'école doctorale et spécialement le directeur Monsieur Marc Pallardy et la secrétaire Mme Lucie Landry.

Enfin je voudrais adresser une pensée toute particulière à ma mère et à Nabil Makhloufi ...

# Merci

## Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre I : Généralités et état de l'art</b>	<b>6</b>
I.1 Quelques rappels sur la lithiase urinaire	6
I.2 Epidémiologie de la lithiase urinaire	8
I.3 La lithogénèse	9
I.4 Les différents types de calculs	11
I.5 La prise en charge thérapeutique	12
<b>Chapitre II : Les techniques de caractérisation dans le contexte des calcifications pathologiques</b>	<b>20</b>
II.1 Quelques généralités	20
II.2 Analyse morpho-constitutionnelle	21
II.2.1 Examen optique et typage morphologique	21
II.2.2 Spectrophotométrie infrarouge à transformé de Fourier	23
II.3 Microscopie électronique à balayage	30
II.4 Le microanalyseur à sonde électronique	36
II.5 Fluorescence X	37
II.6 La diffraction des neutrons.	42
II.7 Etude de l'effet de dissolution des plantes sur les calculs rénaux	44
<b>Chapitre III : Epidémiologie</b>	<b>55</b>
III.1 Classification morphoconstitutionnelle	56
III.2 Répartition des composants lithiasiques	56
III.3 Influence du sexe	61
III.4 Influence de l'âge	65
III.5 La localisation des calculs	65
III.6 Conclusion préliminaire	66
<b>Chapitre IV : Les éléments traces</b>	<b>71</b>
IV.1 Les éléments traces et le tissu biologique	71
IV.2 Résultats	72
IV.3 Discussion	
<b>Chapitre V: Effet des plantes médicinales</b>	<b>80</b>
V.1 Échantillonnage	80
V.2 Résultats	81
V.3 Discussion	87
V.4 Conclusion préliminaire	89
<b>Chapitre VI : Discussion</b>	<b>93</b>
<b>Chapitre VII : Conclusion</b>	<b>98</b>
<b>Liste des figures et des tableaux</b>	<b>100</b>

## INTRODUCTION

Dès l'aube de l'humanité, la présence de calculs rénaux est attestée. Le premier calcul urinaire a été découvert chez un garçon de 15-16 ans dont les restes datant de près de 7000 ans ont été exhumés du cimetière d'El-Amrah, en haute Égypte. De nos jours, la lithiase urinaire, ou " maladie de la pierre " (« lithos » signifiant en grec « pierre ») est une affection très répandue qui touche 4 à 18% de la population selon les pays. En progression dans tous les pays industrialisés, sa fréquence a presque doublé depuis un demi-siècle.

Cette pathologie s'accompagne parfois de douleurs extrêmement violentes, les coliques néphrétiques, provoquées par l'augmentation de la pression des urines dans le rein suite à l'obstruction de l'uretère par le calcul. En cas d'absence d'évacuation naturelle du calcul, différents types d'interventions médicales peuvent être proposés pour libérer les voies urinaires : lithotritie extracorporelle par ondes de choc, urétéroscopie, chirurgie percutanée, chirurgie laparoscopique, chirurgie ouverte, voire néphrectomie lorsque le rein a été détruit par infection en amont de l'obstacle lithiasique.

La lithiase étant une pathologie récidivante dans presque un cas sur deux, il convient de poser un diagnostic étiologique de manière systématique [1]. Celui-ci s'établit notamment sur la base d'une relation entre la nature physico-chimique du calcul et la pathologie [2]. Déterminer la nature physicochimique du calcul passe par une description concise de sa morphologie à l'échelle macroscopique couplée à la mise en œuvre de la spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. Une première difficulté émerge alors en raison d'une part de la nature multiphasique de ces échantillons biologiques et d'autre part de la diversité des phases chimiques présentes puisque plus de 100 constituants ont été identifiés à ce jour dans les calculs urinaires [3]. Les composés chimiques associés à la prévalence la plus grande sont les oxalates de calcium (mono ou dihydraté), les acides uriques (anhydre ou dihydraté), les phosphates calciques (apatites, brushite) et la struvite, ou encore la cystine. Chacun de ces constituants peut présenter différentes morphologies et couleurs qui peuvent être rattachées à des environnements biochimiques particuliers [1, 2], voire à des causes spécifiques [4]. Dans certains cas, la nature chimique particulière des calculs signe une étiologie très spécifique [4, 5]. Dans d'autres cas, malgré une composition chimique et cristalline banale, la morphologie du calcul oriente vers des pathologies ou des causes très particulières [6, 7], d'où l'importance clinique de pratiquer une analyse morfo-constitutionnelle des calculs.

L'objectif premier de cette thèse est de préciser l'épidémiologie des calculs de l'Est Algérien. Pour ce faire, 82 calculs ont été collectés dans des cliniques et des hôpitaux de l'Est

algérien. Cette collection a fait l'objet d'une analyse morpho-constitutionnelle, analyse qui a ensuite été intégrée à une étude plus large puis comparée à des données épidémiologiques provenant soit d'autres régions de l'Algérie soit d'autres pays. Cette analyse montre que l'épidémiologie des lithiases reflète le niveau socioéconomique ainsi que le degré de médicalisation des populations.

Nous avons ensuite complété cette approche classique par une partie plus exploratoire où l'on s'est attaché à mettre en évidence le rôle éventuel des éléments traces dans les processus lithogènes. En effet, de nombreux travaux de la littérature physicochimique et médicale soulignent cette propriété catalytique et il nous a paru important de l'aborder. Ce type de mesures permet aussi de proposer la fluorescence X comme outil de diagnostic en soulignant éventuellement la présence de substances néphrotoxiques (Hg, Cd, Pb, ...).

Enfin, pour les lithiases qui présentent une résistance vis-à-vis de la lithotripsie extracorporelle (LEC) comme la cystine, l'oxalate de calcium type Id et la brushite, nous avons évalué l'efficacité de certaines plantes utilisées en médecine traditionnelle. Cette alternative serait particulièrement intéressante pour des populations ayant un accès difficile aux soins hospitaliers.

### **Quelques références**

- [1] M. Daudon, O. Traxer, P. Jungers, Lithiase Urinaire, 2ème ed., Lavoisier, Médecine Sciences, Paris, 2012, 672 pages.
- [2] M. Daudon, C.A. Bader, P. Jungers, Urinary calculi : review of classification methods and correlations with etiology, *Scan. Microsc.* 1993 ; 7 : 1081 - 1106.
- [3] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, C. Rey, Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications, *Chem. Rev.* 2012 ; 112 : 5092 - 5120.
- [4] I. Ceballos-Picot, J.L. Perignon, M. Hamet, M. Daudon, P. Kamoun, 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis, an underdiagnosed disease, *The Lancet* 1992 ; 339 : 1050 - 1051.
- [5] M. Daudon, L. Estépa, J.P. Viard, D. Joly, P. Jungers, Urinary stones in HIV-1-positive patients treated with indinavir, *The Lancet* 1997 ; 349 : 1294 - 1295.
- [6] M. Daudon, R. Reveillaud, P. Jungers, Piridoxilate- associated calcium oxalate urinary calculi : A new metabolic drug-induced nephrolithiasis, *The Lancet* 1985 ; 325 : 1338-1339.
- [7] M. Daudon, P. Jungers, D. Bazin, Peculiar Morphology of Stones in Primary Hyperoxaluria. *New England J. of Medecine* 2008 ; 359 : 100 - 102.

## Chapitre I : Généralités et état de l'art

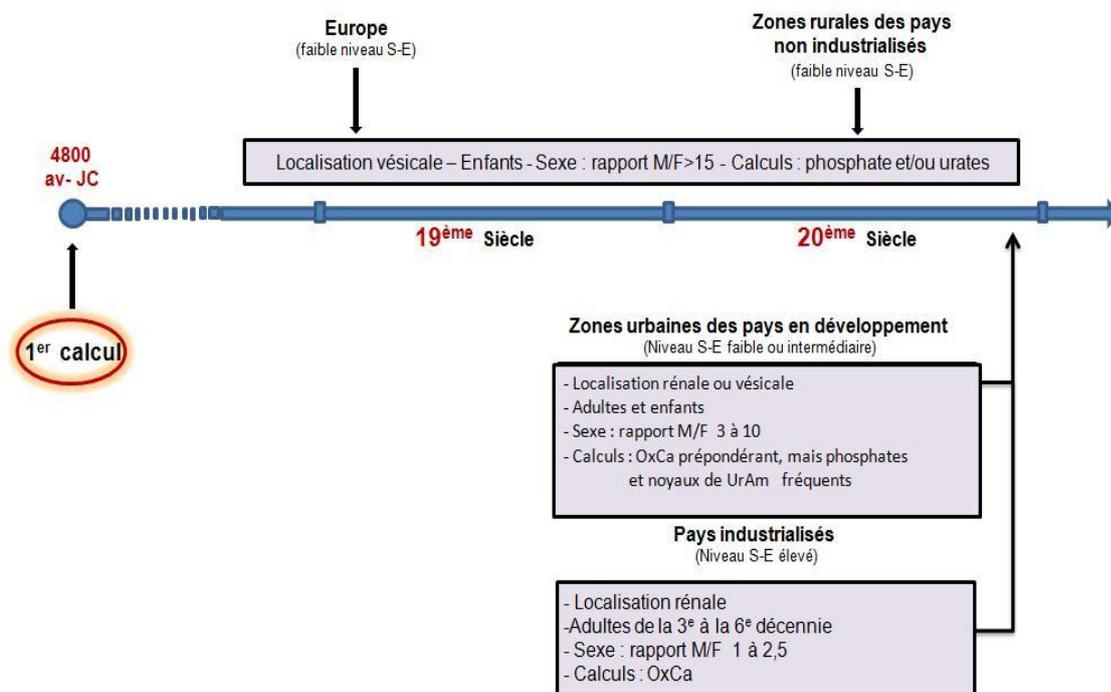
### I.1 Quelques généralités sur la lithiase urinaire

Les calculs urinaires [1-17] sont des calcifications pathologiques, celles-ci se définissant comme toutes formes de dépôts minéraux anormaux, calciques ou non, dans un tissu, un organe ou sur un dispositif médical [18-25]. D'un point de vue médical, au moins trois familles de calcifications pathologiques existent. Une première se réfère aux calculs, qui se définissent comme des concrétions solides formées dans une cavité ou un canal excréteur (calculs rénaux, biliaires, salivaires, vésicaux...). Une deuxième s'associe aux calcifications tissulaires ou ectopiques localisées en dehors des canaux excréteurs (qui peuvent être liées parfois à des pathologies sévères comme les cancers du sein, de la thyroïde, des testicules ou encore de la prostate). Enfin, dans certains cas, des calcifications, au départ physiologiques comme l'os ou la dent, deviennent en partie des calcifications pathologiques suite à une maladie. La lithiase rénale peut être caractérisée soit par des calculs formés dans les voies excrétrices soit par des concrétions initiées à partir de calcifications tissulaires. En effet, les plaques de Randall [26,27], qui sont des calcifications tissulaires présentes au sommet de certaines papilles servent de centre nucléateur et sont donc à l'origine de certains calculs.

Sur le plan physicochimique [23,24,28], les calcifications pathologiques sont des biomatériaux complexes comprenant une partie minérale et une partie organique associées à des éléments traces. L'ensemble exhibe une structure hiérarchique pour la partie minérale dans laquelle des nanocristaux s'assemblent pour former des microcristallites, l'agglomération de ces derniers constituant la calcification [29-31]. Les calcifications pathologiques (mais aussi physiologiques) sont issues d'une chimie douce [32-37] i.e. leur synthèse s'effectue à température et pression ambiantes pour des valeurs de pH qui s'inscrivent dans notre cas entre 5 et 8. On retrouve donc pour les calcifications pathologiques de nombreuses similitudes avec certaines notions de chimie douce (particules Janus, mise en forme par le tissu à l'échelle mésoscopique, ...). La cinétique et la thermodynamique ont des rôles clés dans la compréhension des processus de biochimie qui conditionnent la pathogenèse de ces calcifications. Ainsi dans le cas des calculs d'oxalate de calcium, la thermodynamique est prédominante lorsque l'on s'intéresse aux hyperoxaluries avec comme phase chimique générée la whewellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Au contraire, la thermodynamique s'efface au profit de la cinétique de la réaction dans le cas des hypercalciuries avec cette fois la weddellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) comme phase chimique des calculs. Enfin, deux types de processus de

nucléation primaire existent dans une urine sursaturée. Si une proportion limitée de calculs se forme suivant un processus de nucléation homogène (i.e. une simple précipitation), on observe de plus en plus leur formation dans le cadre d'un processus de nucléation hétérogène liée notamment à la présence à la surface de l'épithélium papillaire d'une calcification appelée plaque de Randall [26,27].

La lithiase est présente dès l'aube de l'humanité, puisque le premier calcul urinaire a été découvert chez un garçon de 15-16 ans dont les restes ont été exhumés du cimetière d'El-Amrah, en haute Egypte [38]. La figure 1 retrace quelques étapes historiques associées à la lithiase durant les 19<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> siècles. Comme on peut le voir, la lithiase reflète le statut socioéconomique du pays [39,40]. Ainsi, au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, comme au siècle précédent, la lithiase des populations de faible niveau socioéconomique est fréquente et affecte généralement les enfants avec une très forte prédominance masculine. Les calculs ont surtout une localisation vésicale. Au niveau chimique, on note la prépondérance de l'urate d'ammonium et des phosphates calciques et magnésiens. Ainsi, leur composition rend compte à la fois d'une hygiène précaire et d'une alimentation à base de céréales et de végétaux, souvent pauvre en phosphore et en protéines animales. Avec l'élévation du niveau de vie, les caractéristiques physicochimiques et la localisation des calculs évoluent, l'oxalate de calcium devenant souvent le constituant majoritaire et la localisation des calculs étant rénale. De plus, la lithiase affecte désormais essentiellement les adultes [41].



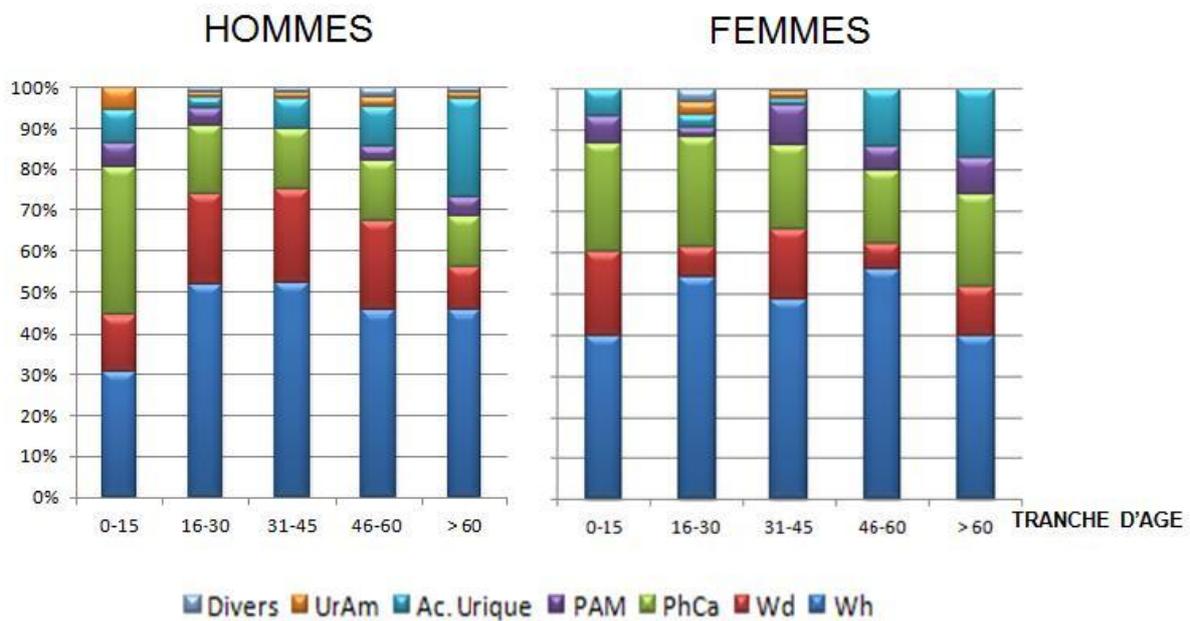
**Figure 1.** Evolution historique et géographique de la lithiase urinaire

## I.2 Épidémiologie de la lithiase urinaire

La prévalence annuelle de la lithiase urinaire a presque triplé en quarante ans (Etats-Unis, Europe occidentale) [42-54]. Ces phénomènes s'expliquent par l'élévation du niveau socio-économique et la modification des habitudes alimentaires (majoration de la proportion de patients obèses, en surpoids ou diabétiques due à des apports plus caloriques et/ou une moindre dépense énergétique). Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, la consommation de sel a été multipliée par 3, celle de protéines par 5 et celle de sucres raffinés par 20. Durant la même période, on assiste à une baisse de la consommation des aliments végétaux riches en fibres et en potassium.

En Algérie, une série de 360 [55] puis de 1354 calculs urinaires de l'adulte [56] provenant de quatre grandes villes de l'ouest algérien a été étudiée. La fréquence de la lithiase vésicale est élevée puisqu'elle représente 45,5% des calculs d'origine masculine traités urologiquement. La composition cristalline montre que l'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) est majoritaire dans 48,1% des calculs et dans 40,6% au niveau des noyaux. La carapatite est le constituant principal dans 24,4% des calculs et dans 21,9% des noyaux. La carapatite est présente dans 77,8% des calculs analysés, la whewellite dans 68,6%, la weddellite dans 56,4%, la struvite dans 20,6%, l'urate acide d'ammonium dans 12,2% et les acides uriques dans 9,4% [55]. Ces chiffres n'ont pas été repris dans l'étude élargie comportant 1354 calculs publiée près de 10 ans plus tard. Cependant, en raison de sa signification pathologique forte, la présence de struvite a été réévaluée dans cette plus grande série [56]. Les données rapportées montrent que 28,8% de l'ensemble des calculs contenaient de la struvite, suggérant une forte implication des infections à germes uréasiques dans la formation ou le développement des calculs observés dans l'Ouest Algérien. L'analyse plus précise des résultats faisait ressortir une plus grande prévalence de la struvite chez la femme (37,8% des calculs) que chez l'homme (24,5%). Au total, la carapatite et la whewellite étaient les principaux composants impliqués dans la lithogénèse des calculs de la région Ouest algérien [55,56]. Dans la même région, cette étude [56] a illustré l'évolution de la composition des calculs en fonction de l'âge (figure 2). Le pic de l'oxalate de calcium se situait dans la tranche 31-45 ans tandis que la carapatite était plus fréquente après 60 ans. Il ressort de l'analyse des données que la lithiase urinaire dans l'Ouest algérien a tendance à évoluer dans le même sens que celle des pays industrialisés. Toutefois, les infections urinaires restent une cause fréquente de lithiase [55,56] par rapport à d'autres études effectuées en Europe [44-46].

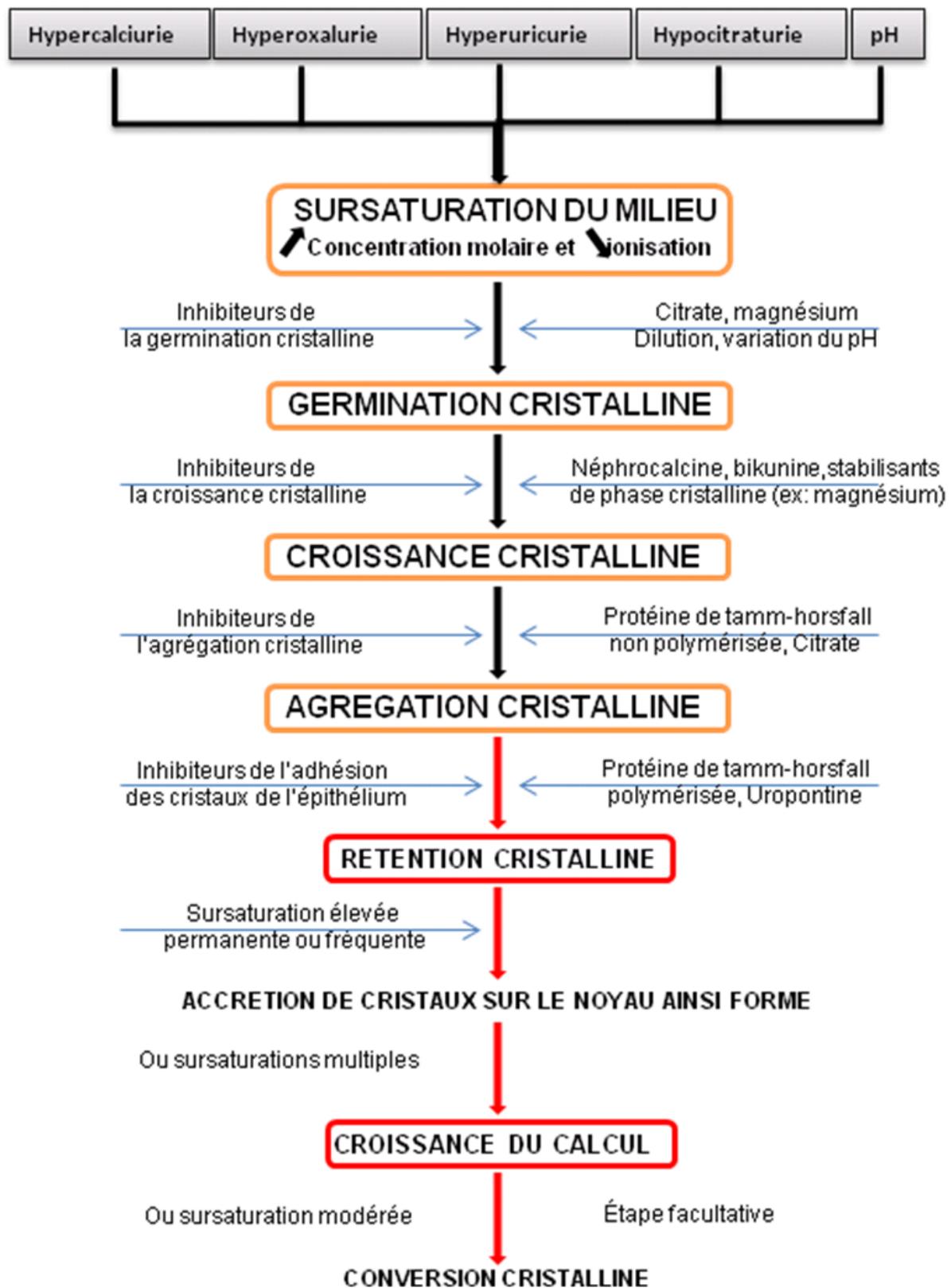
Aucune étude n'a été entreprise sur les calculs urinaires de la région Est algérien.



**Figure 2.** Composition des calculs en fonction de l'âge, sur une série de 1354 calculs provenant des services d'urologie de l'Ouest Algérien [56].

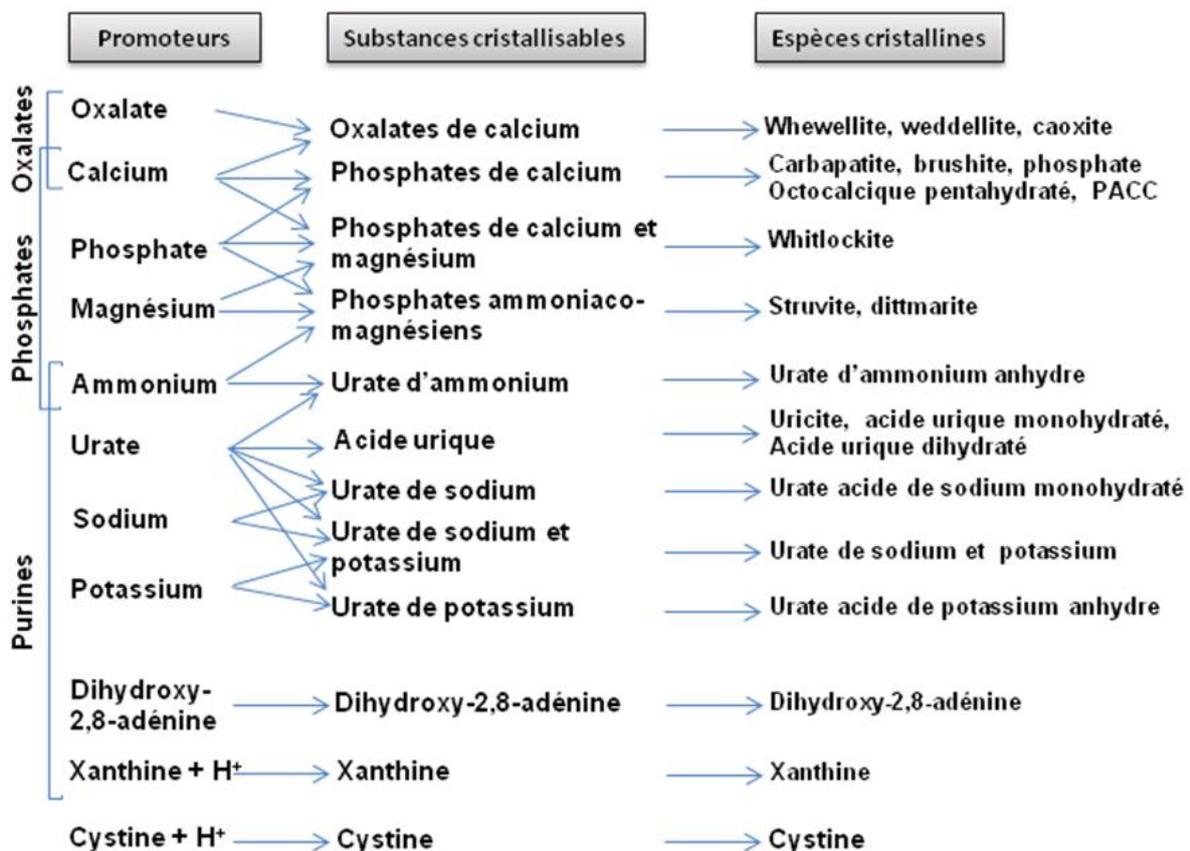
### I.3 La lithogénèse

Nous avons rassemblé sur la figure 3 les principales étapes de la lithogénèse [57]. Cette figure 3 montre la complexité des processus physicochimiques associés ainsi que différents mécanismes biochimiques mis en action par l'organisme afin d'éviter la formation de calcul : variation du pH urinaire, dilution des urines, complexation de certains ions pour limiter la formation d'espèces moléculaires peu solubles, blocage des sites de croissance cristalline par des ions ou des macromolécules (inhibiteurs), protection de l'épithélium urinaire contre l'adhérence cristalline, etc. De ce fait, les principales causes biochimiques de sursaturation des urines, liées à une concentration excessive de calcium, d'oxalate, d'acide urique ou à une concentration insuffisante de citrate, sont contrebalancées par la présence d'autres substances qui vont exercer des effets sur les cristaux eux-mêmes (inhibition de croissance ou d'agrégation) ou leur interaction potentielle avec l'épithélium.



**Figure 3.** Les étapes de la lithogénèse.

Il existe normalement, dans les urines, un équilibre entre promoteurs et inhibiteurs de cristallisation [57,58]. Cet équilibre peut être rompu soit par un excès des promoteurs, soit par un déficit des inhibiteurs (Figure 4). Les ions qui participent à la formation des espèces insolubles sont appelés promoteurs de la cristallisation. Au nombre d'une dizaine, les promoteurs de la cristallisation peuvent agir conjointement ou isolément. Le plus souvent, 2 ou 3 composés sont mis en œuvre pour aboutir à la formation de ces espèces moléculaires peu solubles qui peuvent alors précipiter sous différentes formes cristallines. Ces dernières se forment dans des environnements biologiques différents dont elles témoignent, d'où l'intérêt de les prendre en considération pour identifier les facteurs étiologiques d'une maladie lithiasique.



**Figure 4** : Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines

#### I.4 les différents types de calculs

L'analyse chimique des calculs a été remplacée par une analyse morpho-constitutionnelle fondée sur une description précise à l'échelle macroscopique complétée par une technique de caractérisation par spectroscopie vibrationnelle et plus précisément par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier [59-62]. A l'échelle macroscopique, il

s'agit de préciser la forme, la taille, l'aspect de la surface, la texture, la forme et l'aspect des cristaux, la couleur, la dureté, l'organisation et les principales caractéristiques de la section et, chaque fois que cela est possible, d'identifier le noyau qui a servi de point de départ à la formation du calcul. La spectrophotométrie infrarouge est devenue la méthode de référence en raison de sa polyvalence, de sa rapidité, de sa mise en œuvre aisée et de sa capacité à identifier simultanément les espèces cristallines et non cristallisées, les composants minéraux et organiques, les espèces métaboliques et médicamenteuses (plus de 70 molécules différentes). En revanche, la spectrophotométrie infrarouge ne peut pas identifier un nouveau corps, non encore décrit dans les calculs, comme un nouveau médicament par exemple, même si elle est capable de le détecter. D'autres techniques d'analyse sont alors nécessaires, comme la diffraction X [63] pour identifier plus précisément la nouvelle substance détectée par l'analyse infrarouge. La spectrophotométrie infrarouge ne permet pas non plus de mettre en évidence la présence d'éléments traces.

Les calculs urinaires peuvent être rassemblés au sein d'une classification comportant 6 types et 21 sous types, qui permet de classer plus de 95% des calculs de l'arbre urinaire :

- Les oxalates de calcium [66-69] constituent la classe I pour la whewellite et la classe II pour la weddellite.
- Les calculs d'acide urique et les urates [70-75] forment la classe III
- Les phosphates calciques et magnésiens, soit carbapatite, struvite, brushite, whitlockite [76-80] sont rassemblés dans la classe IV
- Les calculs de cystine (Classe V) sont liés à la cystinurie. Il s'agit d'une anomalie génétique qui entraîne l'excrétion d'une quantité excessive de cystine par les reins. Ce type de calcul peut survenir dès l'enfance [81-85].
- Les calculs constitués de protéines sont rassemblés dans la Classe VI.

Notons l'existence de calculs de l'arbre urinaire d'autre nature comme les calculs d'origine médicamenteuse [86-91] ou les calculs constitués de purines rares liées à des maladies génétiques [92].

### **I.5 La prise en charge thérapeutique**

Historiquement, l'une des premières prises en charge thérapeutique de la lithiase est dénoncée dans le serment d'Hippocrate. Elle s'associe à l'ouverture de la vessie afin d'en extraire les calculs vésicaux. Jusqu'au XVIII<sup>e</sup> siècle, les calculs vésicaux étaient une cause fréquente de souffrance, d'infection et de décès par urémie. Leur extraction par la taille vésicale (incision) était redoutée, jusqu'à l'invention par Claude-Nicolas Le Cat d'un

instrument, le gorgeret-cystotome, qui a permis de réduire la mortalité consécutive à l'ablation de ces calculs [93,94].

Malgré les progrès de la chirurgie dans les décennies suivantes, il a fallu attendre la fin des années 70 pour assister à une révolution de la prise en charge urologique des calculs. Depuis 1980, l'idée de casser un calcul dur dans un rein mou sans endommager ce dernier est en effet devenue une réalité [95]. La lithotripsie ou lithotritie extracorporelle (LEC) est une méthode non invasive très utilisée aujourd'hui. Après un repérage précis du calcul par radiographie ou échographie, elle conduit à la fragmentation du calcul (rénal ou biliaire) grâce à des ondes de choc générées par un lithotriteur [96-102]. Les fragments sont ensuite éliminés dans la majorité des cas par les voies urinaires dans un délai compris entre quelques jours et quelques semaines. Cette méthode ne s'accompagne donc pas d'ouverture chirurgicale.

Si le taux de succès relevé dans la littérature médicale est de 60 à 85%, cette technique n'est pas pour autant sans défaut [104-106]. Dans certains cas, les résidus des fragments du calcul peuvent rester en place dans l'appareil urinaire et donner lieu à des coliques néphrétiques. Eventuellement, un processus infectieux peut se déclencher [107,108] voire dans certains cas une hémorragie [109]. De ce fait, il est utile de chercher une alternative à ces moyens, par exemple en utilisant des plantes médicinales ou la phytothérapie qui pourrait aider à l'expulsion des fragments, voire à prévenir la formation de calculs.

Cette demande pour des traitements par les plantes est de plus en plus importante et il convient de souligner qu'il ne s'agit pas seulement d'une survivance de «pratiques populaires», mais qu'il existe à l'heure actuelle une phytothérapie prescrite sur ordonnance [110]. Selon l'organisation mondiale de la santé, 75% des patients ont recours à la médecine traditionnelle pour leurs soins de base [111]. De nombreuses plantes sont utilisées à plus ou moins bon escient dans plusieurs régions du monde pour le traitement de différentes pathologies [112-119]. En ce qui concerne la sphère urologique, de nombreux travaux concernent la phytothérapie [120-127], ce traitement par les plantes n'étant pas sans risque [128,129]. A titre d'exemple, une étude récente recense 61 plantes médicinales appartenant à 30 familles et réparties en 51 genres dans le cadre des maladies rénales [130]. Parmi les plantes utilisées, citons: *Paronychia argentea* [131-134], *Bergenia ligulata* [135-136], *Humulus lupulus* [137]. Les plantes sélectionnées dans cette étude font toutes parties de la pharmacopée Algérienne [132] et cette étude tente d'apporter des données physicochimiques aux propriétés antilithiasiques supposées de ces plantes en les confrontant à des lithiases difficiles à traiter par la pharmacopée industrielle.

## Références

- [1] P. Jungers, M. Daudon, A. Leduc, Lithiase urinaire, Ed. Médecine-Sciences, Flammarion 1989.
- [2] M. Daudon, Comment analyser un calcul et comment interpréter le résultat, Eurobiol. 1993 ; 27: 35-46
- [3] M. Daudon, L. Estépa, B. Lacour, P. Jungers, Unusual morphology of calcium oxalate calculi in primary hyperoxaluria, J. Nephrol. 1998 ; 11 : 51 - 55.
- [4] M. Daudon, F. Cohen-Solal, B. Lacour, Apport de la morphologie des calculs au diagnostic étiologique des lithiases urinaires, Feuilles de Biologie 2004 ; 35 : 51 – 57.
- [5] M. Daudon, Les différents types de calculs: apport de l'analyse morphoconstitutionnelle au diagnostic étiologique de la lithiase, In: Doré B (ed) Les Lithiases Rénales. Paris, Springer 2004 pp 49 - 77.
- [6] P. Conort, B. Dore, Ch. Saussine, Prise en charge urologique des calculs rénaux et urétéraux de l'adulte, Prog. Urol. 2004 ; 14 : 1095 – 1102.
- [7] M. Daudon, Pourquoi et comment analyser un calcul urinaire ?, Prog. Urol. - FMC 2007 ; 17 : 2 - 6.
- [8] M. Daudon, Cinq calculs – cinq photos – cinq diagnostics – cinq astuces, Prog. Urol. - FMC 2012 ; 22 : F87 – F93.
- [9] F.L. Coe, J.H. Parks, J.R. Asplin, The pathogenesis and treatment of kidney stones, N. Engl. J. Med. 1992 ; 327 : 1141 - 1152.
- [10] P. Jungers, M. Daudon, P. Conort, Lithiase rénale, diagnostic et traitement, Ed. Médecine-Sciences, Flammarion 1999.
- [11] F. Grases, A. Costa-Bauza, M. Ramis, V. Montesinos, A. Conte, Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology, Clin. Chim. Acta 2002 ; 322 : 29 - 36.
- [12] H.G. Tiselius, Epidemiology and medical management of stone disease, B.J.U. Int. 2003 ; 91 : 758 - 767.
- [13] F.L. Coe, A. Evan, E. Worcester, Kidney stone disease, J. Clin. Invest. 2005 ; 115 : 2598 - 2608.
- [14] O.W. Moe, Kidney stones: pathophysiology and medical management, Lancet 2006 ; 367 : 333 - 344.
- [15] J.C. Williams, Unlock the Mysteries of Stone Analysis, B.J.U. Int. 2009 ; 104 : 8 - 12.
- [16] A.P. Evan, Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract, Pediatr. Nephrol. 2010 ; 25 : 831 - 841.
- [17] S.J. Allison, Stones : ascorbic acid and risk of kidney stones, Nat. Rev. Nephrology 2013 ; 9 : 187 - 195.
- [18] S.M. Krasovskaya, L.D. Uzhinova, M.Yu. Andrianova, A.A. Prischenko, M.V. Livantsov, M.V. Lomonosov, Biochemical and physico-chemical aspects of biomaterials calcification, Biomaterials 1991 ; 12 : 817 - 820.
- [18] E. Bonucci, Calcification in biological systems, CRC Press Boca Raton 1992.
- [19] C.M. Giachelli, Ectopic calcification, gathering hard facts about soft tissue ineralization, Am. J. Pathology 1999 ; 154 : 671 - 675.
- [20] S.H. Poggi, K.I. Bostrom, L.L. Demer, H.C. Skinner, B.J. Koos, Placental Calcification: A Metastatic Process ?, Placenta 2001 ; 22 : 591 - 596.
- [21] E. Bonucci, Biological calcification : Normal and pathological processes in the early Stages, Ed. Springer Berlin Heidelberg 2007.
- [22] E. Bauerlein, Handbook of biomineralization: biological aspects and structureformation, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2007.
- [23] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, C. Rey, Characterization and some physico-chemical aspects of pathological microcalcifications, Chem. Rev. 2012 ; 112 : 5092 - 5120.
- [24] D. Bazin, M. Daudon, Pathological calcifications and selected examples at the medicine–solid-state physics interface, J. Phys. D : Appl. Phys. 2012 ; 45 : 383001 - 383010.
- [25] F.J. Schoen, R.J. Levy, Pathological Calcification of Biomaterials, Biomaterials Science (Third Edition), 2013 pp 739 - 754.
- [26] A. Randall, The origin and growth of renal calculi, Ann. Surg. 1937 ; 105 : 1009 -1027.
- [27] A. Randall, An hypothesis for the origin of renal calculus, N. Engl. J. Med. 1936 ; 214 : 234 - 237.
- [28] <http://www.synchrotron-soleil.fr/Soleil/ToutesActualites/2013/Les-calcifications-Pathologiques>
- [29] J.D. Currey, Hierarchies in biomineral structures, Science 2005 ; 309 : 253 - 260.
- [30] S. Mann, Biomineralisation. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry, Oxford University Press. Oxford 2001.
- [31] M. Van Meerssche, J. Feneau-Dupont, Introduction à la cristallographie et à la chimie structurale, Ed. Vander 1973.

- [32] J. Livage, M. Henry, C. Sanchez, Sol-gel chemistry of transition metal oxides, *Progress in Solid State Chemistry* 1988 ; 18 : 259 - 341.
- [33] J. Livage, C. Sanchez, Sol-gel chemistry, *J. of Non-Cryst. Solids* 1992 ; 145 : 11 - 21.
- [34] J. Livage, Sol-Gel Chemistry and Molecular Sieve Synthesis, *Studies in Surface Science and Catalysis* 1994 ; 85 : 1 - 42.
- [35] J. Livage, Sol-gel processes, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 1997 ; 2 : 132 - 138.
- [36] C. Sanchez, B. Julian, P. Belleville, M. Popall, Applications of hybrid organic-inorganic composites, *J. Mater. Chem.* 2005 ; 15 : 3559 - 3592.
- [37] D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, Recent bio-applications of sol-gel materials, *J. Mater. Chem.* 2006 ; 16 : 1013 - 1030.
- [38] S.G. Shattock, Prehistoric or predynastic Egyptian calculus, *Trans. Path. Sci. Lond.* 1905 ; 56 : 275 - 290.
- [39] R. Asper, Epidemiology and socioeconomic aspects of urolithiasis, *Urol. Res.* 1984 ; 12 : 1 - 5.
- [40] M. Daudon, B. Bounxouei, F. Santa Cruz, S. Leite da Silva, B. Diouf, F.F. Angwafoo 3rd *et al.*, Composition des calculs observés aujourd'hui dans les pays non industrialisés, *Prog. Urol.* 2004 ; 14 : 1151 - 1161.
- [41] M. Daudon, J.C. Doré, P. Jungers, B. Lacour, Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach, *Urol. Res.* 2004 ; 32 : 241 - 247.
- [42] C.M. Johnson, D.M. Wilson, W.M. O'Fallon, R.S. Malek, L.T. Kurland, Renal stone epidemiology : a 25-year study in Rochester, Minnesota, *Kidney Int.* 1979 ; 16 : 624 - 631.
- [43] W.G. Robertson, M. Peacock, P.J. Heyburn, F.A. Hanes, Epidemiological risk factors in calcium stone disease, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1980 ; 53 : 15 - 30.
- [44] W. Tschöpe, E. Ritz, M. Haslbeck, H. Mehnert, H. Wesch, Prevalence and incidence of renal stone disease in a German population sample, *Klin. Wochenschr.* 1981 ; 59 : 411 - 412
- [45] E.W. Vahlensieck, D. Bach, A. Hesse, Incidence, prevalence and mortality of urolithiasis in the German Federal Republic, *Urol. Res.* 1982 ; 10 : 161 - 164.
- [46] P. Jungers, M. Daudon, Epidemiology of the kidney stones, *Presse Méd.* 1990 ; 19 : 1655 - 1657.
- [47] J.M. Soucie, M.J. Thun, R.J. Coates, W. McClellan, H. Austin, Demographic and geographic variability of kidney stones in the United States, *Kidney Int.* 1994 ; 46 : 893 - 899.
- [48] M. Daudon, R. Donsimoni, C. Hennequin *et al.*, Sex and age-related composition of 10617 calculi analyzed by infrared-spectroscopy, *Urol. Res.* 1995 ; 23 : 319 - 325.
- [49] A. Serio, A. Fraioli Epidemiology of nephrolithiasis. *Nephron* 1999 ; 81 : 26 - 30.
- [50] O. Yoshida, A. Terai, T. Ohkawa, Y. Okada, National trend of the incidence of urolithiasis in Japan from 1965 to 1995, *Kidney Int.* 1999 ; 56 : 1899 - 1904.
- [51] A. Hesse, E. Brandle, D. Wilbert, K.U. Kohrmann, P. Alken, Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs 2000, *Eur. Urol.* 2003 ; 44 : 709 - 713.
- [52] A. Trinchieri, F. Coppi, E. Montanari, A. Del Nero, G. Zanetti, E. Pisani, Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years, *Eur. Urol.* 2000 ; 37 : 23 - 25.
- [53] M. Daudon, Epidemiology of nephrolithiasis in France, *Annales d'urologie* 2005 ; 39 : 209 - 231.
- [54] M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevalier, C. Saussine, Épidémiologie des lithiases urinaires, *Prog. Urol.* 2008 ; 18 : 802 - 814.
- [55] D. Harrache, Z. Mesri, A. Addou, A. Semmoud, B. Lacour, M. Daudon, Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans l'ouest algérien par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, *L'Eurobiologiste* 1997 ; 31 : 69 - 74.
- [56] Z. Djelloul, A. Djelloul, A. Bedjaoui, Z. Kaid-omar, A. Attar., M. Daudon, A. Addou, Lithiase urinaire dans l'Ouest algérien : étude de la composition de 1354 calculs urinaires en relation avec leur localisation anatomique, l'âge et le sexe des patients, *Prog. Urol.* 2006 ; 16 : 328 - 335.
- [57] M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevallier, C. Saussine, La lithogénèse, *Prog. Urol.* 2008 ; 18 : 815 - 827.
- [58] C. Hennequin, B. Lacour, M. Daudon, Les inhibiteurs de cristallisation, *L'Eurobiologiste* 1993 ; XXVII, 47 - 53.

- [59] M. Daudon, C.A. Bader, P. Jungers, Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology, *Scanning Microscopy* 1993 ; 7 : 1081 - 1106.
- [60] M. Daudon, L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant, *Arch. Pediatr.* 2000 ; 7 : 855-865.
- [61] N. Quy-Dao, M. Daudon, *Infrared and Raman Spectra of Calculi*, Elsevier, Paris 1997.
- [62] M. Daudon, Comment analyser un calcul et comment interpréter le résultat, *L'Eurobiologiste* 1993 ; 27 : 35 - 46.
- [63] A. Le Bail, D. Bazin, M. Daudon et al., Racemic calcium tartrate tetrahydrate [form (II)] in rat urinary stones, *Acta Cryst. B.* 2009 ; 65 : 350 - 354.
- [64] A. Le Bail, M. Daudon, D. Bazin, A new compound in kidney stones? Powder X-ray Diffraction study of calcium glycinate trihydrate, *Acta Cryst.* 2013 ; C69 : 734 - 737.
- [65] M. Daudon, D. Bazin, K. Adil, A. Le Bail, 7,9-Bis(hydroxymethyl)-7H-purine-2,6,8(1H,3H,9H)trione, *Acta Cryst.* 2011 ; E67 : o1458.
- [66] S.R. Khan, Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with Rats, *Am. J. Kidney Dis.* 1991 ; 17 : 398 - 401.
- [67] R.L. Ryall, D.E. Fleming, I.R. Doyle, N.A. Evans, C.J. Dean, V.R. Marshall, Intracrystalline proteins and the hidden ultrastructure of calcium oxalate urinary crystals: Implications for Kidney Stone Formation, *J. of Structural Biology* 2001 ; 134 : 5 - 14.
- [68] M. Daudon, P. Jungers, D. Bazin, Peculiar Morphology of Stones in Primary Hyperoxaluria, *N. Engl. J. of Med.* 2008 ; 359 : 100 - 101.
- [69] M. Daudon, D. Bazin, P. Jungers, G. André, A. Cousson, P. Chevallier, E. Véron, G. Matzen, Opportunities offered by scanning electron microscopy, powder neutron diffraction in the study of whewellite kidney stones, *J. App. Cryst.* 2009 ; 42 : 109 - 115.
- [70] R. Shirley, D.J. Sutor, Anhydrous uric acid: Nature and occurrence of a new form in urinary calculi, *Science* 1967 ; 159 : 544 - 550.
- [71] F. Grases, A.I. Villacampa, A. Costa-Bauza, O. Sohnel, Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation, *Clin. Chim. Acta* 2000 ; 302 : 89 - 104.
- [72] B. Shekarriz, M.L. Stoller, Uric Acid Nephrolithiasis: Current Concepts and Controversies, *The Journal of Urology* 2002 ; 168 : 1307 - 1314.
- [73] M. Daudon, B. Lacour, P. Jungers, High prevalence of uric acid calculi in diabetic stone Formers, *Nephrol Dial Transplant* 2005 ; 20 : 468 - 469.
- [74] J. Bellanato, J.-L. Rodríguez-Miñón Cifuentes, E. Salvador, Medina Urates in uric acid renal calculi, *Int. J. of Urology* 2009 ; 16 : 318 - 322.
- [75] M. Normand, Le traitement médical de la lithiase urique, *Progrès en Urologie - FMC*, In Press.
- [76] L.W. Klee, C.G. Brito, J.E. Lingeman, The clinical implications of brushite calculi, *J. Urol.* 1991 ; 145 : 715 - 718.
- [77] A. Greischar, Y. Nakagawa, F.L. Coe, Influence of urine pH and citrate concentration on the upper limit of metastability for calcium phosphate, *The Journal of Urology* 2003 ; 169 : 867 - 870.
- [78] X. Carpentier, M. Daudon, O. Traxer, P. Jungers, A. Mazouyes, G. Matzen, E. Véron, D. Bazin, Relationships between carbonation rate of carbapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology, *Urology* 2009 ; 73 : 968 - 975.
- [79] M. Daudon, H. Bouzidi, D. Bazin, Composition and morphology of phosphate stones and their relation with etiology, *Urol. Res.* 2010 ; 38 : 459 - 467.
- [80] J.C. Williams, T. Hameed, M.E. Jackson, S. Aftab, A. Gambaro, Y.A. Pishchalnikov, H.E. Lingeman, J.A. McAteer, Fragility of Brushite stones in shock wave lithotripsy : Absence of correlation with computerized tomography visible Structure, *The Journal of Urology* 2012 ; 188 : 996 - 1001.
- [81] F. Barbey, D. Joly, P. Rieu et al., Medical treatment of cystinuria: Critical reappraisal of long-term results, *J. Urol.* 2000 ; 163 : 1419 - 1423.
- [82] R. Ragone, Medical treatment of cystinuria with vitamin C, *Am. J. Kidney Disease* 2000 ; 35 : 1020 - 1030.
- [83] A.P. Evan, F.L. Coe, J.E. Lingeman, Y. Shao, B.R. Matlaga, S.C. Kim, S.B. Bledsoe, A.J. Sommer, M. Grynepas, C.L. Philips, E.M. Worcester, Renal crystal deposits and histopathology of the kidney in cystinuria, *Kidney Int.* 2006 ; 69 : 2227 - 2235.
- [84] H. Bouzidi, M. Daudon, Cystinurie : du diagnostique à la surveillance thérapeutique, *Ann. Biol. Clin.* 2007 ; 65 : 473 - 481.

- [85] E. Letavernier, O. Traxer, J.P. Haymann, D. Bazin, M. Daudon, Cystinurie, *Prog. Urol. – FMC* 2012 ; 22 : F119 - F123.
- [86] G. Zanetta, L. Maurice-Estépa, Ch. Mousson, E. Justrabo, M. Daudon, G. Rifle, Y. Tanter, Foscarnet induced crystalline glomerulonephritis with nephrotic syndrome and acute renal failure after kidney transplantation, *Transplantation* 1999 ; 67 : 1376 - 1378.
- [87] M. Augusti, J.C. Mikaelian, H. Monsaint, D. Brin, M. Daudon, Calcul urinaire de silice secondaire à l'absorption de gélopectose chez l'enfant, *Prog. Urol.* 1993 ; 3 : 812 - 815.
- [88] M. Daudon, P. Jungers, Drug-induced renal calculi, *Drugs* 2004 ; 64 : 245 - 275.
- [89] G.B. Fogazzi, G. Garigali, C. Brambilla, M. Daudon, Ciprofloxacin crystalluria, *Neph. Dial Transplant* 2006 ; 21 : 2982 - 2983.
- [90] S. Chutipongtanate, V. Thongboonkerd, Ceftriaxone crystallization and its potential role in kidney stone formation, *Biochem. and Biophysical Res. Com.* 2011 ; 406 : 396 - 402.
- [91] N.C. Bush, K. Twombly, J. Ahn, C. Oliveira, S. Arnold, N.M. Maalouf, K. Sakhaee, Prevalence and spot urine risk factors for renal stones in children taking topiramate, *J. of Pediatric Urology*, In Press.
- [92] G. Bollée, C. Dollinger, L. Boutaud, D. Guillemot, A. Bensman, J. Harambat, P. Deteix, M. Daudon, B. Knebelmann, I. Ceballos-Picot, Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 ; 21 : 679 - 688.
- [93] Ph. Grise, Claude-Nicolas Le Cat (1700-1768), un grand nom de la Chirurgie et de l'Urologie au 18ème siècle, *Progrès en Urologie* 2001 ; 11 : 149 - 153.
- [94] P. Berteau, Claude Nicolas Le Cat, *Revue Médicales Normandes* 1971 ; 10 : 7 - 33.
- [95] C. Chaussy, W. Brendel, E. Schmidt, Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves, *Lancet* 1980 ; 2 : 1925 - 1930.
- [96] C. Chaussy, G. Fuchs, La lithotritie extracorporelle dans le traitement de la lithiase rénale, *J. Urol.* 1986 ; 92 : 339 - 343.
- [97] M. Sackmann, M. Delius, T. Sauerbruch, J. Holl, W. Weber, E. Ippisch et al., Shock-wave lithotripsy of gallbladder stones. The first 175 patients, *N. Engl. J. Med.* 1988 ; 318 : 393 - 397.
- [98] W. Sass, M. Bräunlich, H.-P. Dreyer, E. Matura, W. Folberth, H.-G. Priesmeyer, J. Seifert, The mechanisms of stone disintegration by shock waves, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 1991 ; 17 : 239 - 243.
- [99] D. Cathignol, J. Tavakkoli, J.L. Mestas, Lithotritie extracorporelle, *ITBM-RBM* 2000 ; 21 : 4 - 10.
- [100] J.J. Rassweiler, C. Renner, C. Chaussy, S. Thüroff, Treatment of renal stones by extracorporeally induced shockwave lithotripsy, *Eur. Urol.* 2001 ; 39 : 187 - 199.
- [101] K.T. Pace, D. Ghiculete, M. Harju, R.J. D'Honey, Shock wave lithotripsy at 60 or 120 shocks per minute : a randomized double-blind trial, *The J. of Urology* 2005 ; 174 : 595 - 599.
- [102] B. Doré, Techniques et indications de la lithotritie extracorporelle (LEC) en urologie, *Annales d'Urologie* 2005 ; 39 : 137 - 158.
- [103] E. Lechevallier, O. Traxer, C. Saussine, Lithotritie extracorporelle des calculs du haut appareil urinaire, *Progrès en Urologie* 2008 ; 18 : 878 - 885.
- [104] J.A. McAteer, A.P. Evan, The acute and long-term adverse effects of shock wave Lithotripsy, *Seminars in Nephrology* 2008 ; 28 : 200 - 213.
- [105] Y.Q. Xue, D.-L. He, X.-F. Chen, X. Li, J. Zeng, X.-Y. Wang, Shock Wave induced kidney injury promotes calcium oxalate deposition, *The Journal of Urology* 2009 ; 182 : 762 - 765.
- [106] E.H. Lambert, R. Walsh, M.W. Moreno, M. Gupta, Effect of escalating versus fixed voltage treatment on stone comminution and renal injury during extracorporeal shock wave lithotripsy: A prospective randomized trial, *The Journal of Urology* 2010 ; 183 : 580 - 584.
- [107] C. Dincel, E. Ozdiler, H. Ozenci, N. Taxici, A. Kosar, Incidence of urinary tract infection in patients without bacteriuria undergoing SWL: comparison of stone types, *J. Endourol.* 1998 ; 12 : 1 - 3.
- [108] G. Reid, M.A. Jewett, J.C. Nickel, R.J. McLean, A.W. Bruce, Effect of extracorporeal shock wave lithotripsy on bacteria viability. Relationship to the treatment of struvite stones, *Urol. Res.* 1990 ; 18 : 425 - 427.
- [109] G.M. Sare, F.R. Llyod, E.R. Strom, Life-threatening haemorrhage after extracorporeal shockwave lithotripsy in a patient taking clopidrogel, *B.J.U. Int.* 2002 ; 90 : 469 - 472.
- [110] H. Lamendin, G. Toscano, P. Requirand, Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires, *EMC-Dentisterie* 2004 ; 1 : 179 - 192.
- [111] C. I. Bagnis, G. Deray, A. Baumelou, M. Le Quintrec, J. L. Vanherweghem, Herbs and the kidney, *AJKD* 2004 ; 44 : 1 - 11

- [112] H. Azimi, M. Fallah-Tafti, A.A. Khakshur, M. Abdollahi, A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments, *Fitoterapia* 2012 ; 83 : 1306 - 1317.
- [113] A. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, M. Serhrouchni, W. Benjelloun, Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *J. of Ethnopharmacology* 1997 ; 58, 45 - 54.
- [114] K. Karunamoorthi, E. Tsehaye, Ethnomedicinal knowledge, belief and self-reported practice of local inhabitants on traditional antimalarial plants and phytotherapy, *J. of Ethnopharmacology* 2012 ; 141 : 143 - 150.
- [115] S.G. Dias Oliveira, F.R. Reis de Moura, F.F. Demarco, P. da Silva Nascente, F.A. Burkert Del Pino, R. Guerra Lund, An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian unified health system, *J. of Ethnopharmacology* 2012 ; 140 : 428 - 437.
- [116] M.J. Mukazayire, V. Minani, Ch.K. Ruffo, E. Bizuru, C. Stévigny, P. Duez, Traditional phytotherapy remedies used in Southern Rwanda for the treatment of liver diseases, *J. of Ethnopharmacology* 2011 ; 138 : 415 - 431.
- [117] P. Perrin, M. Auges, N. Rahhali, C. Taieb, PUK6 BPH patients treated with phytotherapy in Portugal: Results at Six Months, *Value in Health* 2011 ; 14 : A331 – A335.
- [118] M. Xu, C. Qi, B. Deng, P. X. Deng, C. W. Mo, Phytotherapy versus hormonal therapy for postmenopausal bone loss: a meta-analysis, *Osteoporos Int.* 2009 ; 20 : 519 - 526.
- [119] R.C. Dedhia, K. T. McVary, Phytotherapy for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia, *The Journal of Urology* 2008 ; 179 : 2119 - 2125.
- [120] F. Grases, G. Melero, A. Costa-Bauza, R. Prieto, J.G. March, Urolithiasis and phytotherapy, *Int. Urol. Nephrol.* 1994 ; 26 : 507 - 511.
- [121] M.M. Malini, M. Lenin, P. Varalakshmi, Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal induced peroxidative changes in experimental urolithiasis, *Pharmacological Research* 2000 ; 41, 413 - 418.
- [122] B. Ballabh, O.P. Chaurasia, Z. Ahmed, S. Bala Singh, Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh used against kidney and urinary disorders, *J. of Ethnopharmacology* 2008 ; 118 : 331 - 339.
- [123] F. Grases, R.M. Prieto, I. Gomila, P. Sanchis, A. Costa-Bauzá, Phytotherapy and renal stones: the role of antioxidants. A pilot study in Wistar rats, *Urol. Res.* 2009 ; 37 : 35 - 40.
- [124] T. Kaur, R. K. Bijarnia, S. K. Singla, C. Tandon, In vivo efficacy of *Trachyspermum ammi* anticalcifying protein in urolithiatic rat model, *J. of Ethnopharmacology* 2009 ; 126 : 459 - 462.
- [125] J.N. Cornu, O. Cussenot, F. Haab, B. Lukacs, A widespread population study of actual medical management of lower urinary tract symptoms related to benign prostatic hyperplasia across Europe and beyond official clinical guidelines, *European Urology* 2010 ; 58 : 450 - 456.
- [126] S. Bashir, A. H. Gilani, Antirolithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: An explanation of the underlying mechanisms, *J. of Ethnopharmacology*, 2009 ; 122, 106 - 116.
- [127] S. Bashir, A. H. Gilani, Antirolithic effect of berberine is mediated through multiple Pathways, *European J. of Pharmacology* 2011 ; 651 : 168 - 175.
- [128] C. R.D. Colson, M.E. De Broe, Kidney injury from alternative medicines, *Advances in Chronic Kidney Disease* 2005 ; 12 : 261 - 275.
- [129] Z. Sokar, C.A. Gadhi, A. Benharref, M. Jana, Toxic effect of *Herniaria cinerea* DC. on the stomach, intestine, lung, and kidney of rats, *J. of Ethnopharmacology* 2003 ; 88 : 149 - 153.
- [130] A. Lengani, L. F. Lompo, I. P. Guissou, J.B. Nikiema, Médecine traditionnelle et maladies des reins au Burkina Faso, *Nephrol. Ther.* 2010 ; 6 : 5 - 10.
- [131] S. Bouanani, C. HENCHIRI, E. Migianu-Griffoni, N. Aouf, M. Lecouvey, Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats, *J. of Ethnopharmacology* 2010 ; 129 : 38 - 45.
- [132] A. Beloued, *Plantes médicinales d'Algérie*. OPU, Alger 1998 ; pp 74–84.
- [133] A. Braca, A.B. Tiziana, S.N. De Tommasi, Secondary metabolites from *Paronychia Argentea*, *Magnetic Resonance in Chemistry* 2008 ; 46 : 88 - 93.
- [134] D. Zama, Z. Meraihi, S. Tebibel, W. Benayssa, F. Benayache, S. Benayache, A. Vlietinck, Chloropyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L., *Ind. J. of Pharm.* 2007 ; 39 : 145 - 150.
- [135] S. Bashir, A.H. Gilani, Antirolithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: An explanation of the underlying mechanisms, *J. of Ethnopharmacology* 2009 ; 122, 106 - 116.

- [136] B. Ballabh, O.P. Chaurasia, Z. Ahmed, S.B. Singh, Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh—Used against kidney and urinary disorders, *J. of Ethnopharmacology* 2008 ; 118 : 331 - 339.
- [137] A. Frąckowiak, T. Koźlecki, P. Skibiński, W. Gaweł, E. Zaczyńska, A. Czarny, K. Piekarska, R. Gancarz, Solubility, inhibition of crystallization and microscopic analysis of calcium oxalate crystals in the presence of fractions from *Humulus lupulus* L, *J. of Crystal Growth* 2010 ; 312 : 3525 - 3532.

## **Chapitre II : Les techniques de caractérisation dans le contexte des calcifications pathologiques**

### **II.1 Quelques notions de physicochimie associées aux calcifications pathologiques**

Nombreuses sont les techniques de caractérisation mises en œuvre afin de préciser les spécificités physicochimiques des calculs urinaires [1,2]. Parmi elles, nous pouvons distinguer les techniques de laboratoire comme la microscopie électronique à balayage qui en décrit la topologie [3-6], la spectrophotométrie infrarouge, qui en donne la composition chimique, la diffraction des rayons X qui en donne aussi la composition chimique à condition que la phase soit cristallisée et indique la taille des cristaux [7-9], la tomographie qui dévoile la répartition dans l'espace des différentes phases chimiques [10] ou encore la fluorescence X induite par des photons, des électrons ou des protons qui en établit la composition élémentaire [11-15].

Parmi cette première série de techniques de caractérisation, la spectrophotométrie infra rouge est particulièrement adaptée [16-18]. En effet, elle permet de mettre en évidence des phases chimiques dépourvues d'ordre à grande distance comme le phosphate amorphe de calcium carbonaté qui a une signification clinique importante [19]. Elle autorise aussi l'évaluation du taux de carbonatation des apatites qui au-delà d'une certaine valeur indique un processus infectieux [6, 20]. Sur ces deux critères majeurs, elle s'avère donc bien supérieure aux autres techniques de laboratoire (y compris bien sûr les analyses chimiques) lorsque l'on s'intéresse à la lithiase.

Récemment, l'étude des calculs urinaires [21-23] et plus largement des calcifications pathologiques a bénéficié de techniques liées aux grands instruments comme le rayonnement synchrotron [24] ou le réacteur nucléaire de recherche [25]. Sur les centres de rayonnement synchrotron sont implantées les techniques de caractérisation utilisant donc le photon comme sonde de la matière. Parmi elles citons les techniques de diffusion-diffraction des rayons X [26,27], la fluorescence X [28-33] ou encore la spectrophotométrie infra rouge à transformée de Fourier (I.R.-T.F.) [34-37] mais aussi des techniques spécifiques comme la spectroscopie d'absorption X [38-43]. En ce qui concerne la fluorescence X et la diffraction des rayons X, ces deux techniques de caractérisation s'avèrent dans ces nouvelles conditions expérimentales aptes à décrire plus finement la matière puisque la taille du faisceau sonde est désormais de l'ordre du micromètre, le rapport signal/bruit étant lui aussi bien supérieur en raison de la brillance exceptionnelle de la source. Notons qu'en ce qui concerne la nouvelle source de troisième génération française SOLEIL, Source Optimisée de Lumière d'Énergie

Intermédiaire du Lure, opérationnelle depuis 2006, la première expérience a été effectuée sur un calcul rénal [44,45].

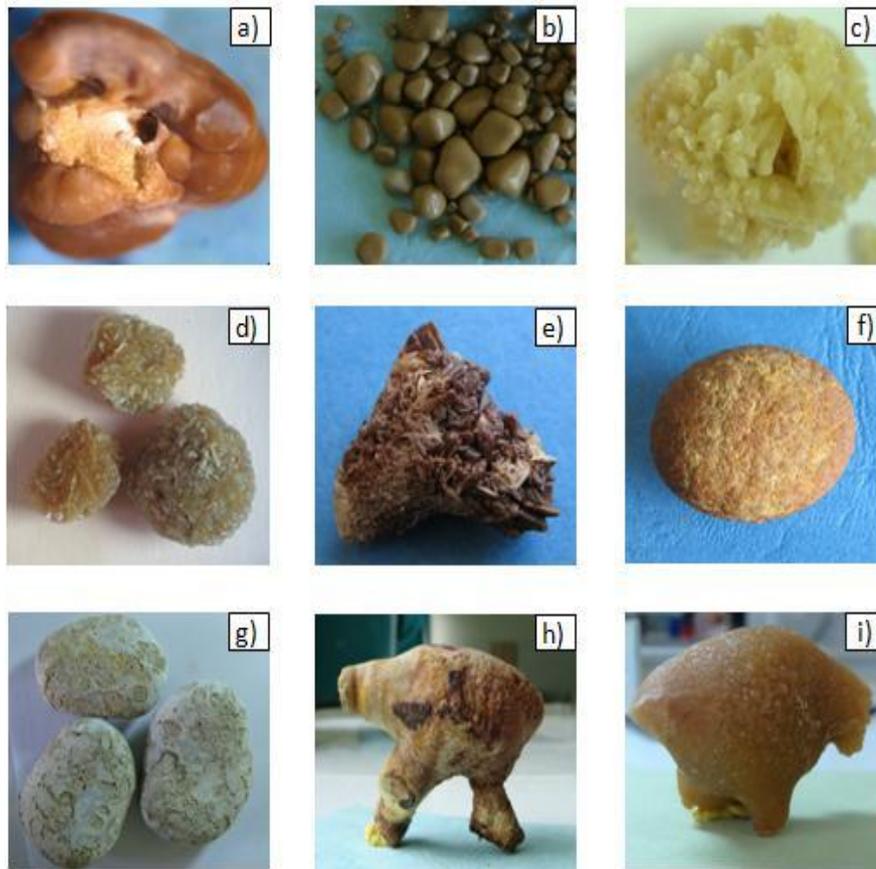
Nous ne présenterons pas dans ce chapitre la physique sous-jacente à chacune des techniques dans la mesure où de nombreux excellents ouvrages existent. Seule une présentation succincte est effectuée au cours de laquelle la nature des informations structurales est discutée.

## **II.2 Analyse morpho-constitutionnelle des calculs**

L'approche morpho-constitutionnelle comporte l'aspect morphologique qui consiste à déterminer le typage morphologique de chaque calcul par loupe binoculaire et l'aspect constitutionnel qui s'attache à déterminer sa composition chimique par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. L'association de ces deux approches, morphologique et constitutionnelle, oriente vers des étiologies particulières et spécifiques de lithogénèse.

### **II.2.1 Examen optique et typage morphologique**

La détermination du type morphologique du calcul (Figure 1) s'effectue à l'aide d'une loupe binoculaire éclairée par des fibres optiques (grossissement entre 10 et 40 fois) pour définir la structure du calcul en fonction des caractéristiques de sa surface (texture, aspect des cristaux, couleur, particularités morphologiques : ombilication avec une plaque de Randall). Le calcul peut être ensuite coupé afin d'examiner la section (noyau, couches profondes, couches médianes et couches périphériques du calcul) ce qui permet d'avoir une idée de son évolution temporelle. L'examen morphologique sert également à choisir les prélèvements qui seront analysés par spectrophotométrie infrarouge. Ils doivent être choisis judicieusement pour être représentatifs des différentes étapes de la formation du calcul.



**Figure 1.** Exemples de quelques types morphologiques de calculs urinaires collectés au niveau des hôpitaux et cliniques de l'Est Algérien :

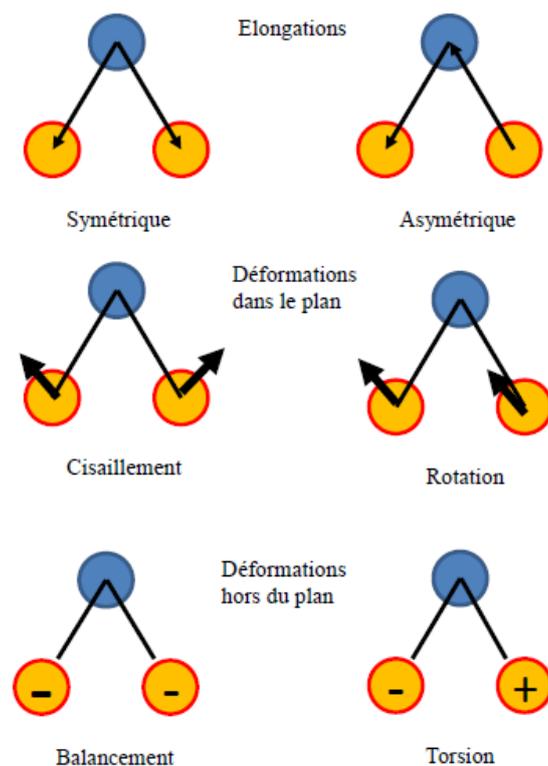
- (a) Calcul d'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) de type Ia présentant une ombilication d'origine papillaire avec un dépôt de carbapatite de type IVa<sub>1</sub> (plaque de Randall). Dimensions : 6x5x4 mm
- (b) Calcul d'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) de type Id de surface lisse homogène. Dimensions moyennes : 7x5x5 mm
- (c) Calcul d'oxalate de calcium dihydraté (weddellite) de type IIa présentant des cristaux bipyramidaux aplatis. Dimensions : 11x9x8 mm
- (d) Calcul d'oxalate de calcium présentant un début de conversion cristalline weddellite – whewellite par déshydratation in situ des cristaux de weddellite : cristaux aux angles plus ou moins émoussés. Dimensions : 12x10x8 mm (le plus gros)
- (e) Calcul d'oxalate de calcium présentant une conversion cristalline weddellite – whewellite très avancée. Dimensions : 22x20x17 mm
- (f) Calcul d'acide urique de type IIIa. Dimensions : 26x24x18 mm
- (g) Calcul présentant en surface un dépôt d'urate d'ammonium de type IIIc (sur une structure sous jacente d'acide urique de type IIIa). Dimensions moyennes : 32x28x22 mm
- (h) Calcul coralliforme à surface hétérogène de type IVb composé de carbapatite et de struvite. Dimensions : 46x42x24 mm
- (i) Calcul coralliforme à surface cristalline homogène de type Va composé de cystine pure. Dimensions : 48x42x28 mm

## II.2.2 Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier.

Découvert par Herschel [46], le rayonnement infrarouge signifie « en deçà du rouge » (du latin infra : « plus bas »). L'infrarouge, dont la longueur d'onde est comprise entre 780 nm et 1000  $\mu\text{m}$ , est une onde électromagnétique d'énergie inférieure à celle de la lumière rouge. L'infrarouge (IR) est subdivisé usuellement en trois régions, l'IR proche (PIR : de 0,78  $\mu\text{m}$  à 1,4  $\mu\text{m}$ ), IR moyen (MIR : de 1,4 à 25  $\mu\text{m}$ ) et IR lointain (de 25  $\mu\text{m}$  à 1000  $\mu\text{m}$ ). En ce qui nous concerne, le domaine infrarouge (moyen) sur lequel sont réalisées les mesures correspond à des longueurs d'onde  $\lambda$  comprises entre 2,5 et 25  $\mu\text{m}$  (soit pour le nombre d'onde  $\nu = 1/\lambda$  des valeurs comprises entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$ ). La plupart des spectrophotomètres utilisés en routine sont construits pour couvrir cette plage de longueurs d'ondes. La région comprise entre 1500  $\text{cm}^{-1}$  et 400  $\text{cm}^{-1}$  est usuellement appelée "empreinte digitale" et comprend un grand nombre de bandes. Dans la partie comprise entre 4000  $\text{cm}^{-1}$  et 1000  $\text{cm}^{-1}$  sont positionnées la plupart des bandes caractéristiques des groupes fonctionnels.

Par absorption d'un photon, l'énergie de vibration de la molécule peut s'accroître dans la mesure où cette énergie correspond à une différence d'énergie entre deux niveaux. On distingue alors des vibrations dites fondamentales et des transitions dites harmoniques ou de combinaison (qui s'associent à des nombres quantiques de vibration supérieurs ou égaux à 1). Dans ces transitions de combinaison, un photon excite deux ou plusieurs vibrations simultanément en augmentant le nombre quantique de chaque niveau énergétique. On explique ainsi pourquoi on obtient généralement un nombre de bandes plus important que celui prévu par la formule "3 N-6" avec N nombre d'atomes [47-49].

Chaque bande d'absorption correspond donc à un saut entre deux niveaux vibrationnels et à une vibration de certains groupements d'atomes (Figure 2). Les vibrations de valence s'associent préférentiellement à des élongations suivant les axes de liaisons (notées  $\nu$ ). D'autres sont plutôt reliées à des déformations d'angle de valence et sont dénommées "vibrations de déformation". Ces déformations peuvent avoir lieu dans le plan des deux liaisons concernées (notées  $\delta$ ) ou hors du plan (notées  $\gamma$  ou  $\rho$ ). Les vibrations ne donnent pas lieu systématiquement à une absorption. Pour cela, il faut que la vibration donne lieu à une variation du moment dipolaire. Ainsi, pour une molécule linéaire ABA, seuls les modes antisymétriques sont actifs en IR.



**Figure 2.** Différents types de vibrations (élongations, déformations dans le plan, déformations hors du plan).

La majorité des vibrations fondamentales des molécules organiques se trouve dans le moyen IR. La position des bandes peut s'expliquer qualitativement en considérant la liaison chimique comme un ressort possédant une constante de raideur définie par la nature de la liaison (approche classique de la théorie vibrationnelle). Plus la liaison est forte (simple, double ou triple), plus la fréquence de résonance est grande. On définit alors la fréquence de vibration (ou de résonance) par :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Avec:

- $k$  : constante de raideur,
- $\mu$  : masse réduite des deux atomes.

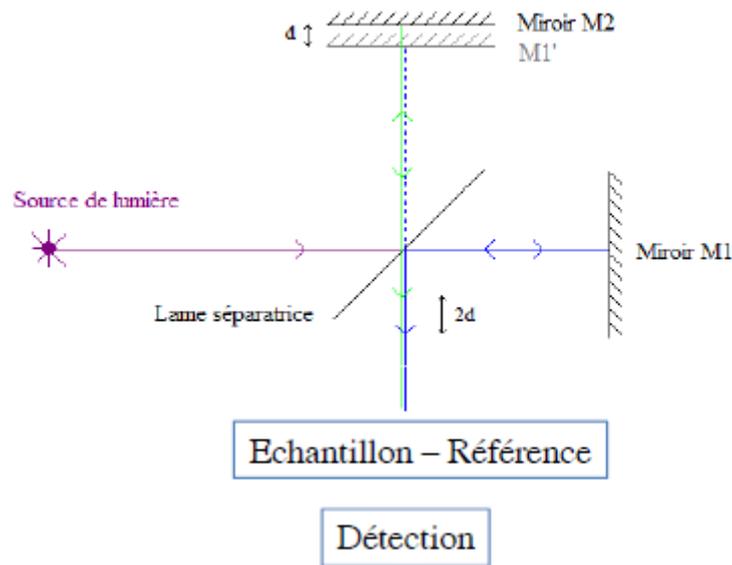
On peut ainsi comprendre simplement la position relative dans le spectre d'absorption des liaisons C-C puisque  $\nu$  est proportionnelle à  $k$  et donc  $\nu_{\text{C}\equiv\text{C}} > \nu_{\text{C}=\text{C}} > \nu_{\text{C}-\text{C}}$ . De même, on peut classer les différentes liaisons C-H, C-C, C-F, C-Cl, C-Br, C-I, puisque  $\nu$  est inversement proportionnelle à la masse réduite  $\mu$  [50]. Finalement, même si l'attribution des fréquences de vibration dépend fortement de  $\mu$  et  $k$ , de nombreux facteurs internes ou externes

à la molécule ont une influence sur la fréquence de vibration. L'environnement et la conformation jouent un rôle sur la fréquence de la vibration. Ainsi, pour les calculs urinaires composés d'oxalate de calcium, il nous est possible de distinguer l'oxalate de calcium monohydraté du dihydraté, même si ces deux composés ont des formules stœchiométriques très proches.

L'analyse quantitative passe par les lois de Kirchhoff, de Beer-Lambert (pour les mesures réalisées en transmission) et de Kubelka-Munk (pour les mesures réalisées en réflexion diffuse). La loi de Kirchhoff,  $T + \rho + A = 1$ , relie simplement  $T$  la transmittance ( $I/I_0$ ),  $\rho$  la réflectance ( $I_R/I_0$ ), et  $A$  l'absorption. La densité optique  $d$  est associée à la transmittance par la relation  $d = \log(1/T)$ . La loi de Beer-Lambert permet de relier l'intensité d'une bande à la concentration  $c$  et peut s'écrire  $\text{Log}(I_0/I) = a(\text{absorptivité}) \cdot b(\text{trajet optique de la cellule de mesure}) \cdot c(\text{concentration})$ . Dans le cas d'expériences réalisées en réflexion diffuse, la lumière diffusée est collectée par un jeu de miroirs paraboliques de grande dimension. La fonction de réémission appelée aussi fonction de Kubelka-Munk est alors proportionnelle à la concentration.

Sur le plan expérimental, contrairement au spectromètre dispersif, le spectromètre IRTF ne contient aucun élément dispersif [51,52]. Toutes les longueurs d'onde sont détectées et mesurées simultanément grâce à l'intégration d'un interféromètre de Michelson dont le principe est schématisé sur la figure 3a. Au sein d'un spectromètre IRTF, une lame séparatrice semi-transparente divise le faisceau issu de la source en deux faisceaux, l'un réfléchi vers un miroir fixe, l'autre transmis vers un miroir mobile. Le miroir mobile, perpendiculaire au miroir fixe, se déplace à une vitesse constante le long de son axe. Comme nous le verrons ci-dessous, plus la distance de déplacement du miroir mobile est grande, plus la précision de la mesure est élevée. En pratique, la résolution spectrale est largement suffisante pour des analyses de routine lorsque la distance de déplacement du miroir est de quelques millimètres, ce qui permet de faire des spectrophotomètres de faible encombrement conservant une grande précision de mesure. Les données collectées par le détecteur produisent un interférogramme. La référence utilisée pour la mesure est généralement l'air. On peut aussi, lorsque l'on travaille en pastille de bromure de potassium, utiliser pour la référence une pastille de KBr ne contenant pas d'échantillon.

Le principe d'un spectromètre infrarouge est schématisé sur la figure 3.



**Figure 3.** Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge.

On définit le paramètre  $x$  comme le retard, c'est-à-dire la différence des parcours optiques de la partie réfléchi et de la partie transmise. Ainsi, l'intensité du rayonnement IR émis par la source est sujette, avant d'atteindre l'échantillon, à une transformation  $S(\lambda) \rightarrow I(x)$  au travers l'interféromètre. Une simple transformée de Fourier lie en fait  $S(\lambda)$  et  $I(x)$ . On conçoit ainsi que le processus de génération d'un spectre IR de l'échantillon comporte 4 étapes (enregistrement d'un interférogramme simple-faisceau de référence sur le support porte-échantillon, enregistrement d'un interférogramme simple-faisceau échantillon, transformation de Fourier inverse des interférogrammes et opérations post-Fourier, calcul du spectre d'absorbance (ou transmittance) à partir des spectres simple faisceau).

Résolution spectrale et parcours du miroir mobile sont deux paramètres complètement dépendants (le critère de Rayleigh). Ainsi, plus on augmente le parcours du miroir mobile, plus on augmente la résolution spectrale. A titre d'exemple, une résolution spectrale de  $4 \text{ cm}^{-1}$  demandera au minimum un retard  $x$  de  $0,25 \text{ cm}$ . La résolution spatiale est limitée à la fois par le rapport signal sur bruit et par la diffraction. En approximant la limite de résolution par la diffraction à  $2\lambda/3$  [53], on obtient une valeur comprise entre  $1,7 \mu\text{m}$  (à  $4000 \text{ cm}^{-1}$ ) et  $13 \mu\text{m}$  (à  $500 \text{ cm}^{-1}$ ).

Finalement, il convient de souligner les avancées spectaculaires effectuées en spectroscopie infra rouge en substituant à la source interne le rayonnement synchrotron [54-

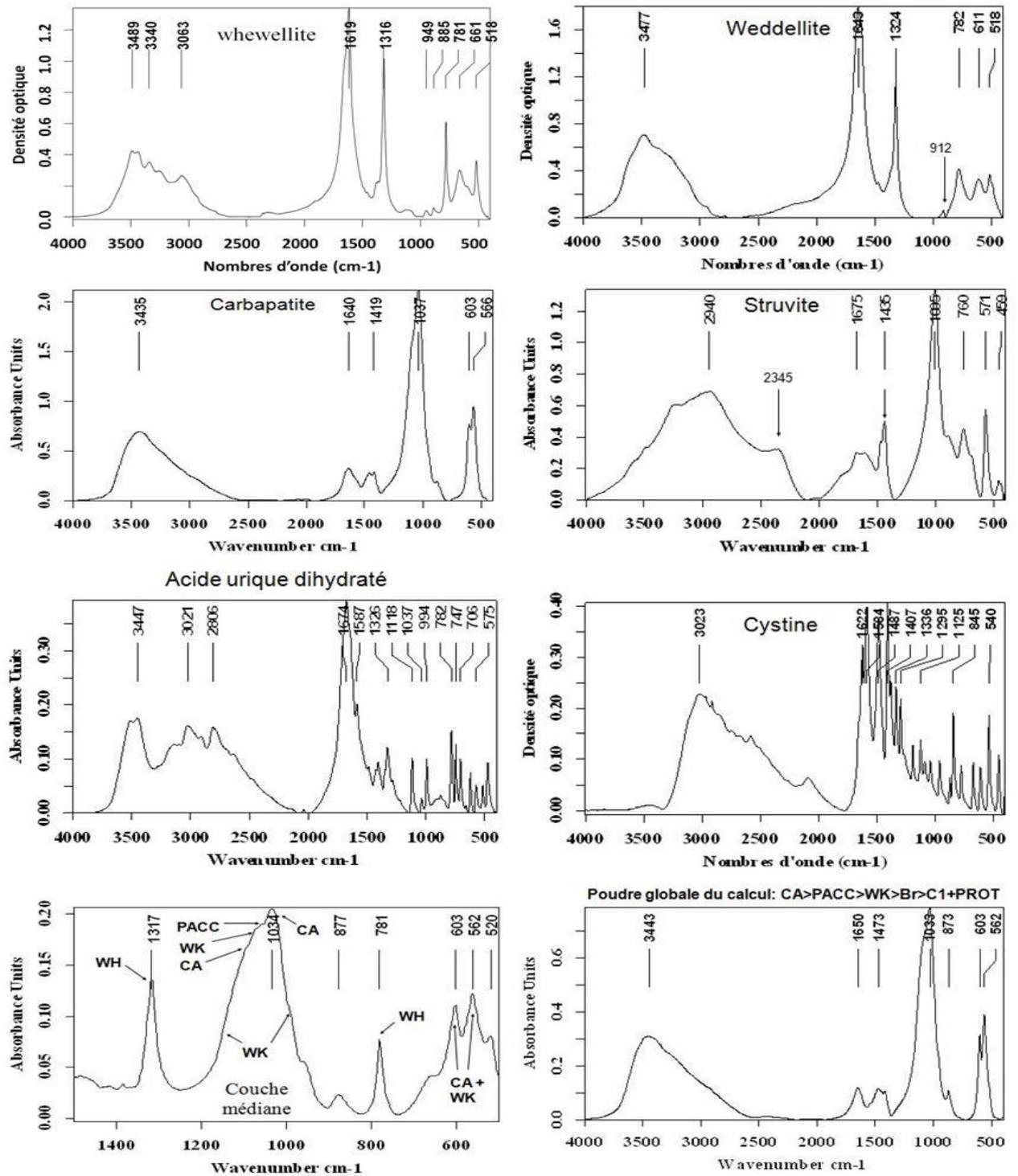
56]. Le point de départ du rayonnement synchrotron est donné par un français, Alfred-Marie Lienard qui publie en 1898 le premier calcul correct donnant la puissance rayonnée par une charge en mouvement accélérée [57]. Dans la mesure où l'on conçoit un dispositif avec une trajectoire fermée, le Pr Oliphant à Birmingham montre en 1943 qu'il faut synchroniser la fréquence de la tension accélératrice avec le moment de passage des particules. Sur le plan expérimental, ce sont des électrons qui, circulant à une vitesse proche de celle de la lumière dans un aimant de courbure, ont leur cheminement de ce fait modifié et génèrent une émission de lumière dite rayonnement synchrotron. Nombreux sont les anneaux de stockage dédiés à l'étude de la matière. En fait, il en existe aujourd'hui plus d'une cinquantaine à travers le monde, chacun étant doté d'une quarantaine de stations expérimentales fonctionnant 24h/24 et 7 jours sur 7 [58,59].

Ce changement de source permet des expériences de spectroscopie infrarouge avec une résolution spatiale limitée non par le rapport signal sur bruit mais par la diffraction [60-69]. Une partie significative de ces expériences de spectroscopie vibrationnelle (Spectroscopies infrarouge et Raman) porte sur le diagnostic médical. Comme le rapportent F. Draux [70] et C. Kendall et coll. [71], la sensibilité de la technique permet de travailler à l'échelle cellulaire ou de zones tissulaires de faibles dimension, ce qui a conduit à utiliser les outils de microspectroscopie vibrationnelle issus du rayonnement synchrotron pour l'étude des tissus cancéreux, en particulier dans le cas des cancers bronchique [72-74], de la sphère otorhinolaryngologique [75], du sein [76-78], de l'œsophage [79], du colon [80] ou de la prostate [81-82]. Les cancers ne sont pas les seules pathologies concernées [83]. De plus, dans certaines pathologies, le diagnostic s'effectue par le biais des calcifications [78, 84].

Si ce type d'expériences n'est pas pertinent pour l'étude des calculs rénaux en routine, la caractérisation des calcifications ectopiques dans le tissu rénal par spectroscopie infrarouge implantée sur le rayonnement synchrotron a permis la mise en évidence d'une grande diversité chimique des calcifications tissulaires rénales [36]. De plus, ce type de montage permet un diagnostic précoce de certaines pathologies particulièrement sévères comme le déficit en Adénine PhosphoRibosylTransférase (APRT) [36] puisqu'il devient possible de caractériser des microcristaux. Les cartographies chimiques des différents composés basées sur les raies d'absorption IR qui leur sont associées sont désormais réalisables à l'échelle de quelques micromètres ( $\approx 5\mu\text{m}$ ). Dès lors, il devient possible de combiner la physiologie et la physicochimie à une échelle subcellulaire. L'intégration de la génétique dans cette démarche ouvre alors des perspectives exceptionnelles dans la compréhension des processus biochimiques qui sous-tendent la pathogénèse des calcifications ectopiques.

En ce qui concerne cette étude sur les calculs rénaux, j'ai réalisé les spectres infrarouges à l'hôpital Necker sur un spectromètre de type Bruker IFS25 (Bruker Spectrospin) couvrant le domaine spectral de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Le temps d'acquisition d'un spectre est de l'ordre de 0,5 s sachant qu'une trentaine de spectres sont collectés pour un échantillon inclus dans une pastille de KBr de 13 mm de diamètre obtenue de la manière suivante : un échantillon de 0,5 à 1 mg, parfois moins, représentant une zone d'intérêt d'un calcul (noyau, couches internes, surface...) est placé dans un mortier en agate et mélangé dans une proportion de 0,5 à 1% avec un support inerte transparent en infrarouge, le bromure de potassium. Le mélange, finement broyé et homogénéisé, est ensuite placé dans un moule métallique spécial auquel est appliquée une pression de 10 tonnes/ $\text{cm}^2$  afin d'obtenir une pastille transparente d'environ 0,5 mm d'épaisseur. Celle-ci est alors placée sur le trajet du faisceau infrarouge à l'aide d'un support spécial et le spectre est enregistré contre l'air utilisé comme référence.

La figure 4 illustre les profils infrarouges obtenus pour les principaux constituants des calculs urinaires.



CA = carbapatite - PACC = phosphate amorphe de calcium caronaté – WH = whewellite -  
 WK = whitlockite

**Figure 4.** Différents spectres de calculs collectés à l'hôpital Necker.

### II.3 Microscopie électronique à balayage

Depuis son apparition, le microscope électronique à balayage (MEB) s'est révélée être un puissant outil de caractérisation texturale et chimique locale de matériaux massifs [85-90]. Basé sur l'interaction électron – matière, le terme “électronique ” témoigne de l'utilisation d'électrons comme particule sonde et celui de “balayage” rappelle que c'est au cours du déplacement du faisceau d'électrons sur la surface de l'échantillon que se construit l'image de la surface de l'échantillon sur l'écran de visualisation.

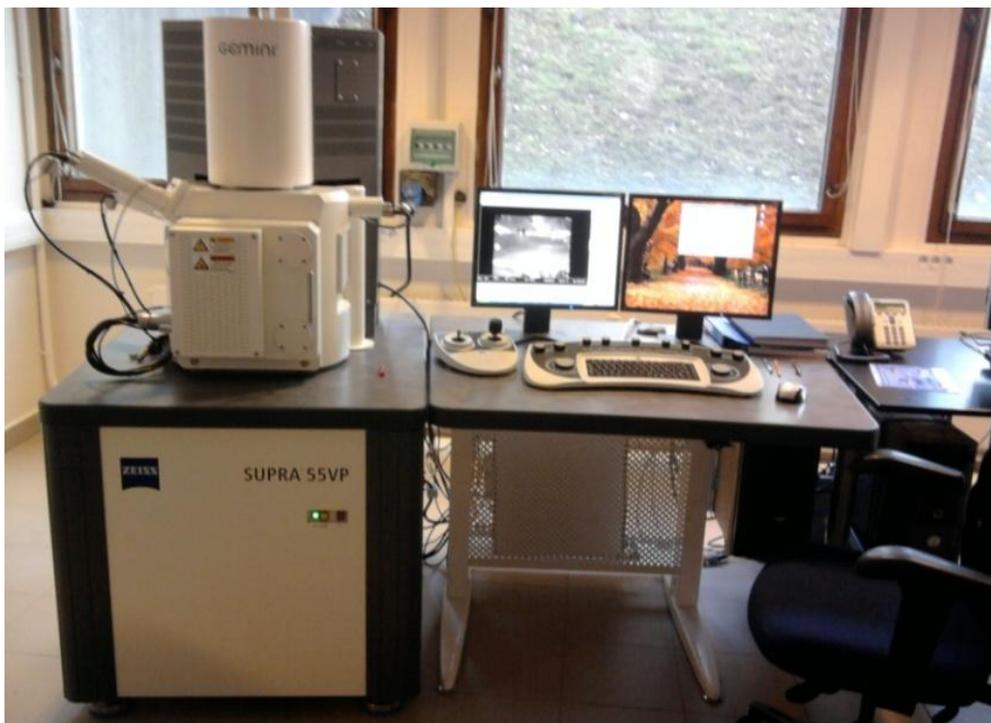
Deux types d'interactions sont concevables lorsqu'un électron d'énergie  $E$  pénètre dans un échantillon. La diffusion « élastique » c'est-à-dire une interaction sans perte d'énergie mais avec un changement de direction de l'électron s'associe à l'interaction de l'électron avec le nuage électronique d'un atome. La section efficace de diffusion élastique varie en  $Z^2/E^2$ . Pour un échantillon léger, la trajectoire de l'électron dans ces conditions est relativement linéaire, celui-ci progressant profondément dans le matériau. La diffusion inélastique c'est-à-dire une interaction avec perte d'énergie et sans changement de direction s'observe lorsque l'interaction s'effectue individuellement avec un électron du matériau. Dans ce cas, des électrons dits secondaires peuvent être éjectés et l'émission de photons dont l'énergie est caractéristique des éléments composant le matériau peut être observée. Notons que si l'angle de diffusion est supérieur à  $\pi/2$ , l'électron incident est susceptible de ressortir du matériau. Dans ces conditions, la collection des électrons rétrodiffusés permettra d'effectuer une analyse chimique. On désigne par « poire de diffusion » l'enveloppe de toutes les trajectoires des électrons primaires incidents au sein du matériau.

De manière simplifiée, on peut ainsi résumer les informations attendues. La texture est décrite en collectant les électrons secondaires. En effet, leur énergie est faible ( $<50\text{eV}$ ) et par conséquent leur libre parcours moyen est de l'ordre de quelques nanomètres. Le contraste des images provient ainsi du fait que la quantité d'électrons secondaires émis est minimale lorsque le faisceau électronique est perpendiculaire à la surface de l'échantillon et augmente proportionnellement suivant son inclinaison. La répartition des phases dans le matériau est décrite de manière qualitative par les images en électrons rétrodiffusés (contraste de numéro atomique). Une analyse élémentaire locale peut être conduite en mesurant l'énergie des photons de fluorescence émis par l'échantillon. La résolution des images est intimement liée à la zone sur laquelle le signal (associé aux électrons primaires rétrodiffusés, aux électrons secondaires ou aux photons de fluorescence X) est émis. Dans le cas des électrons primaires rétrodiffusés, cette zone d'échappement est de l'ordre d'une centaine de nanomètres et dépend

bien sûr du matériau. Pour les électrons secondaires (qui ont une faible énergie), cette zone d'émission est de l'ordre d'une dizaine de nanomètres. Enfin, pour des photons de fluorescence, cette zone d'échappement dépend fortement de leur énergie.

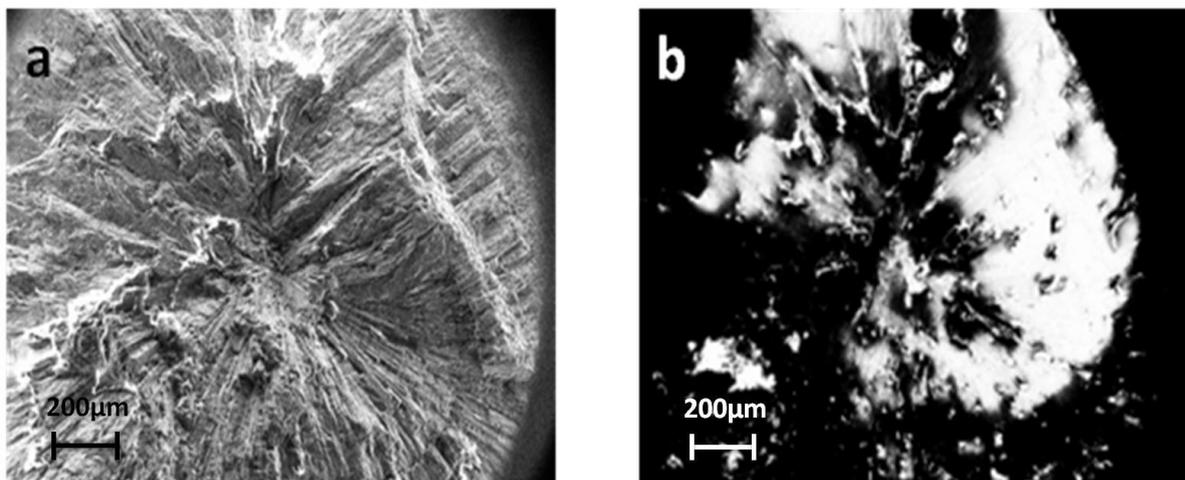
L'ensemble des observations a été réalisé au LPS grâce au microscope Zeiss SUPRA55VP/Gemini (Figure 5). Les électrons sont produits par une pointe à effet de champ puis accélérés dans la première partie de la colonne. La première lentille appelée condenseur réduit la taille de la source, la seconde focalise le faisceau d'électrons primaires sur l'échantillon. Suite aux aberrations (aberration chromatique, sphérique, processus de diffraction électronique, astigmatisme) associées aux lentilles électroniques, on définit généralement une sphère de confusion qui rend compte de l'élargissement de la sonde électronique.

En raison du caractère isolant de nos échantillons, des électrons primaires de faible énergie (tension accélératrice de 2KV) ont été utilisés. On utilise ainsi le fait que l'équilibre des charges est effectif pour des tensions accélératrices oscillant entre 1 et 2 KV. En effet, le rendement total d'émission d'électrons secondaires créés par les électrons primaires  $\sigma$  varie avec leur énergie.



**Figure 5.** Microscope électronique à balayage (MEB) Zeiss SUPRA55VP/Gemini (LPS)

Pour ce qui est de la détection (Figure 6), le microscope implanté à Orsay comprend deux détecteurs d'électrons secondaires ; le premier est un détecteur de troisième génération situé dans la colonne : High Efficiency InLens detector (InLens), qui permet d'intercepter les électrons secondaires de basse énergie procurant un contraste de phase chimique, l'autre plus courant, un Everhert - Thornel Secondary Electron Detector (SE2), est situé au niveau de la chambre. La colonne est maintenue en ultravide grâce à une pompe turbo moléculaire et à deux pompes ioniques.



**Figure 6.** Deux photographies d'un calcul rénal oxalocalcique type Ia obtenues sur le microscope électronique à balayage du même site avec les deux détecteurs : a) est obtenue avec le détecteur SE2, b) est obtenue avec le détecteur InLens.

En raison de la géométrie particulière associée à ces deux détecteurs (Figure 5), le détecteur SE2 (*photo de gauche*) permet de mieux appréhender le relief de la structure tandis que le détecteur sur InLens (*photo de droite*) permet de visualiser des détails mais en ayant le contraste moins porté sur la topographie. Le détecteur InLens peut donner un contraste chimique et permet de visualiser les différentes arrêtes de l'échantillon avec plus de netteté (accumulation de charge).

Ce type de dispositif a été largement utilisé en médecine afin d'apprécier la calcification de dispositifs médicaux comme les stérilets [91], les implants mammaires [92], les valves cardiaques [93], les implants oculaires [94,95], des stents vasculaires [96-99], les

sondes urinaires [100,101]. De plus, nombreuses sont les calcifications pathologiques qui ont fait l'objet d'une étude reposant en partie sur cette technique d'imagerie [102-105].

Dans le cadre de ces observations à l'échelle mésoscopique, il convient de s'intéresser à l'une des propriétés physiques des cristaux : leur morphologie [106]. De nombreux cristaux se présentent sous la forme de polyèdres convexes limités par des faces planes. Notons que pour développer une morphologie typique, les faces du cristal doivent pouvoir croître sans entrave.

Il convient de rappeler certaines notions concernant la cristallographie morphologique i.e. l'étude des caractères géométriques des polyèdres cristallins [106]. Comme le présentent les auteurs [106], la forme des cristaux est régie par des lois inhérentes aux angles entre les faces ou entre les arêtes telles que la loi de constance des angles, la loi des indices rationnels simples et la loi de symétrie. La première, énoncée en 1669 indique que, dans les cristaux d'une même espèce cristalline, l'extension des faces n'est pas un caractère constant. Au contraire, les angles entre les faces ou les arêtes sont constants chez tous les individus de l'espèce. La loi de Haüy (1784) précise que les faces et les arêtes ne sont pas définies au hasard. Les faces des polyèdres sont représentatives des plans réticulaires denses. Si cette loi de Haüy limite les orientations possibles pour les faces, elle ne permet pas pour autant de prévoir celles qui se développent réellement. La troisième loi dite loi de symétrie semble évidente. Dans la mesure où les faces des polyèdres correspondent à des plans réticulaires, la symétrie morphologique est liée à la symétrie du réseau. Toutefois, cette symétrie morphologique peut être inférieure à la symétrie réticulaire. En fait, le groupe ponctuel morphologique n'est autre que le groupe ponctuel (moins les éléments de translation) des éléments de symétrie de la maille.

Dès lors, il est possible, à partir de la morphologie des cristaux, d'en déduire les caractéristiques cristallographiques des phases chimiques (Figure 7). Ainsi les cristaux de cystine ( $C_3H_6NO_2S$ ,  $a = b = 5.412\text{Å}$ ,  $c=55.956\text{Å}$ , groupe d'espace  $P6_122$ ), exhibent une morphologie hexagonale, morphologie cohérente avec la structure cristallographique de ce composé [107,108].

De même, pour les cristaux de weddellite ( $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$ ,  $a = 12.30\text{ Å}$ ,  $c = 7.34\text{ Å}$  groupe d'espace  $I4/m$ ) qui s'observent sous la forme de bipyramide [109-111].

Pour les cristallites d'oxalate de calcium monohydraté ( $CaC_2O_4 \cdot H_2O$ ,  $a=6.316\text{ Å}$ ,  $b=14.541\text{ Å}$ ,  $c = 10.116\text{ Å}$ , groupe d'espace  $P2_1/c$ ) [112-115], l'existence de plusieurs morphologies a été précédemment dévoilée [116]. L'un des points majeurs de ces

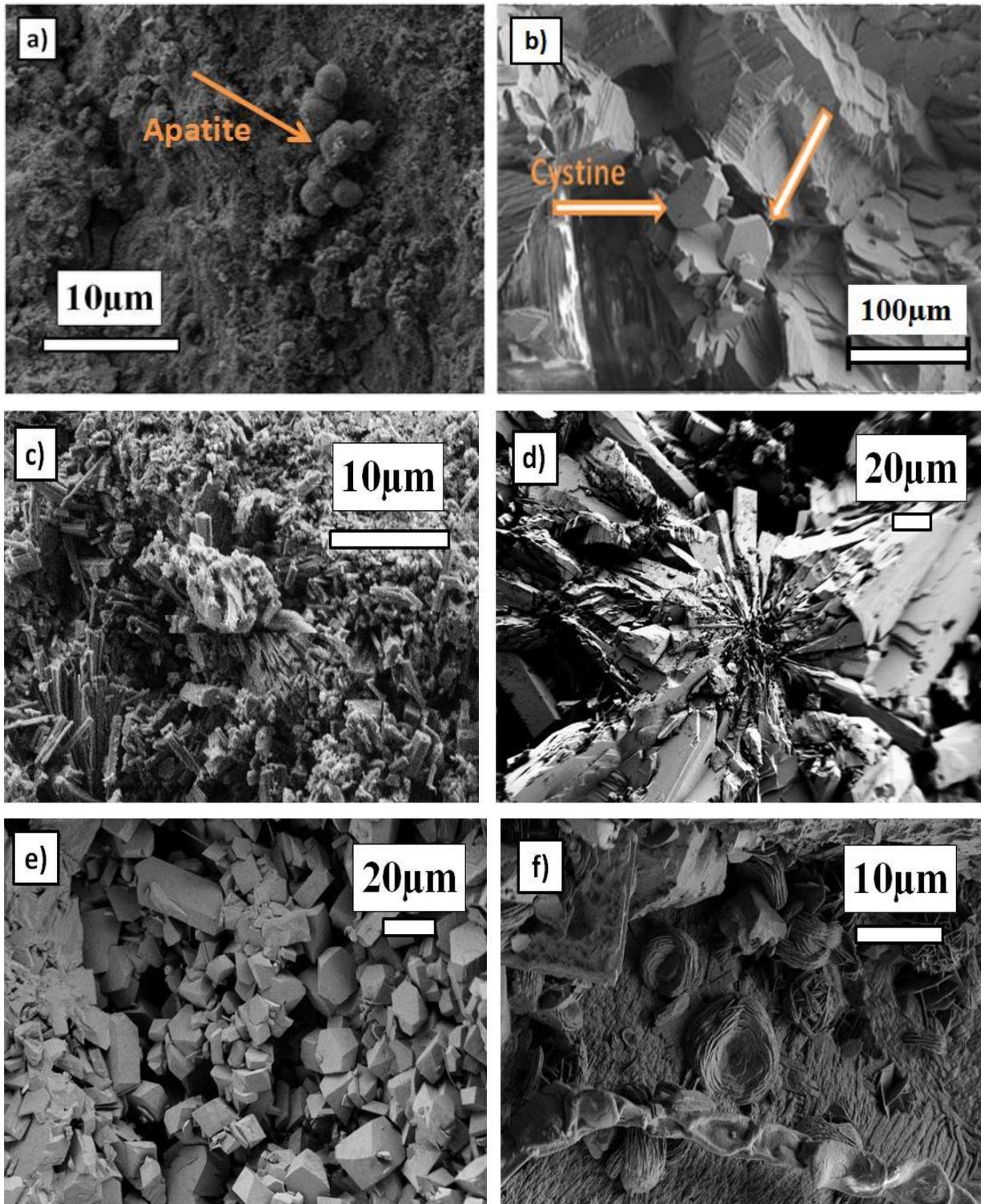
observations est l'opportunité offerte par la microscopie électronique à balayage de poser le diagnostic dans le cas d'une pathologie sévère telle que l'hyperoxalurie primaire [117]. Cette approche par une technique de physicochimie est bien plus rapide que l'approche effectuée par la génétique et plus fiable dans la mesure où tous les gènes déficitaires n'ont pas encore été identifiés.

Les cristaux de brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $a = 5,812 \text{ \AA}$ ,  $b = 15,180 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,239 \text{ \AA}$  et  $\beta = 116^\circ 25'$ , groupe d'Ia) [118,119] se présentent généralement en plaquettes et parfois en aiguilles [120,121]. Le phosphate octocalcique triclinique ( $\text{OCP}_t$ ,  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $a = 19,692 \text{ \AA}$ ,  $b = 9,523 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,835 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90,15^\circ$ ,  $\beta = 92,54^\circ$  et  $\gamma = 108,65^\circ$  groupe d'espace P1) se distingue par une morphologie particulière en rose des sables [122]. Il existe aussi un phosphate octocalcique apatitique  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_{2,5}(\text{PO}_4)_{3,5}(\text{OH})_{0,5}$ .

Pour d'autres composés, ce sont des structures spécifiques à la surface des cristaux qui permettent d'identifier le composé chimique. Ainsi pour la struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $a = 6,941 \text{ \AA}$ ,  $b = 6,137 \text{ \AA}$ ,  $c = 11,199 \text{ \AA}$ , groupe d'espace  $\text{Pmn}2_1$ ), la surface des cristaux présente une structure spécifique en « patte d'oie » [123-126].

A l'opposé, la morphologie typique des phosphates de calcium de structure apatitique biologique ( $\text{Ca}_{10-x+u}\text{M}_x\text{M}'_{x-u}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x\text{OH}_{2-x+2u}\text{M}''_{x-2u}$ ,  $a = b = 9,41844 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,88374 \text{ \AA}$ , groupe d'espace  $\text{P}6_3/\text{m}$ ) est sphérique [6]. Cette morphologie sphérique observée à l'échelle mésoscopique s'explique par l'agglomération de cristaux de phosphates de calcium de structure apatitique de taille nanométrique [127-131]. Pour cette phase chimique, il convient de rechercher à la surface de ces sphères des empreintes de bactéries, ces empreintes mettant en évidence un processus infectieux puisque l'arbre urinaire est supposé être stérile [132,133].

La figure 7 illustre différentes morphologies de cristaux observées dans les calculs de l'appareil urinaire. Les clichés ont été obtenus à partir des calculs dont la nature a été déterminée par spectrophotométrie infrarouge.



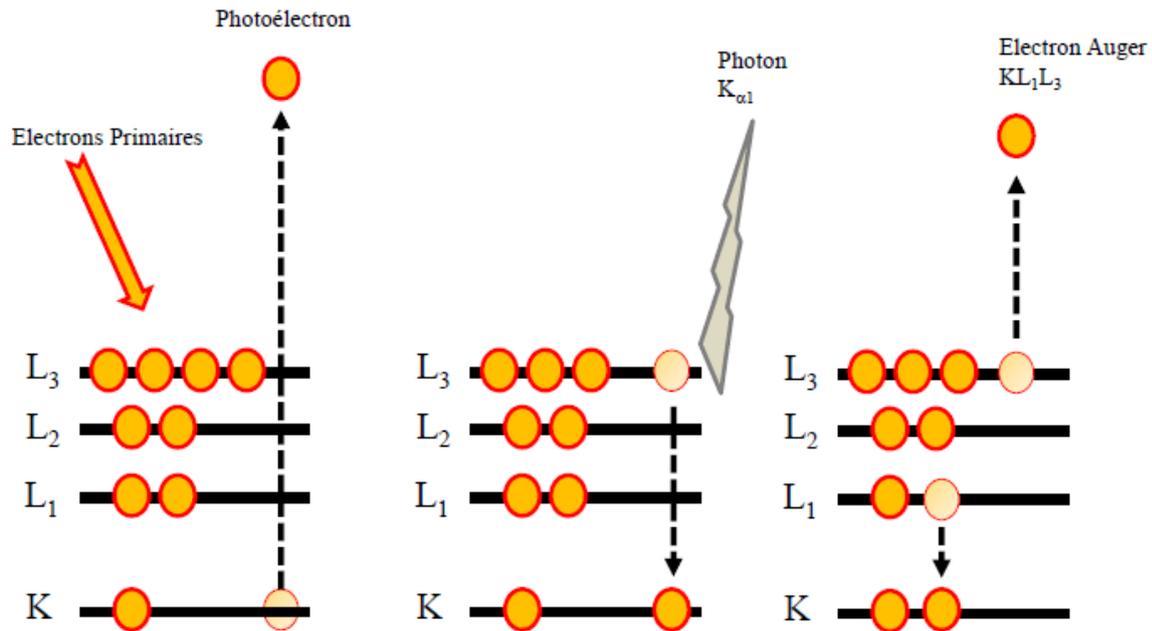
**Figure 7.** Différentes morphologies observées au MEB a) annaba 135: sphères d'apatite; b) annaba 214: cystine (+PACC); c) annaba 163: urate d'ammonium ; d) annaba 170: brushite (avec apatite au centre); e) annaba 222: acide urique anhydre; f) annaba52: whewellite (plus weddellite).

## II.4 Le microanalyseur à sonde électronique

Présenté pour la première fois à la première conférence européenne sur la microscopie électronique à Delft par R. Castaing [134], le microanalyseur à sonde électronique conçu sous la direction d'A. Guinier constitue désormais une technique d'analyse chimique incontournable aussi bien en physique, en chimie ou bien encore en science des matériaux [135-138]. Dans la thèse de physique de R. Castaing, on retrouvera en détails les bases de la physique associées à cet outil de caractérisation [139]. Les photons de fluorescence X générés par l'impact des électrons du faisceau incident sont recueillis par un détecteur apte à déterminer précisément leur nombre pour une énergie donnée. L'analyse du spectre d'émission nous permet de déterminer la nature des éléments présents au sein du matériau ainsi que la concentration massique de l'élément sélectionné dans le volume analysé. Il est donc possible de procéder à des cartographies chimiques des différents éléments constitutifs de la zone sélectionnée.

On dénote aisément la similitude qui existe entre ce microanalyseur à sonde électronique et un dispositif de fluorescence X. La différence majeure entre ces deux techniques de caractérisation se situe bien sûr au niveau de la sonde mais aussi au niveau du seuil de détection des éléments. Ainsi, dans le cas des calculs urinaires (et des calcifications pathologiques et physiologiques en général), seuls les éléments majeurs c'est-à-dire ceux présents dans la formule stœchiométrique des phases chimiques présentes dans le matériau donnent un signal de fluorescence X mesurable. Les éléments traces tel que le Zn par exemple ne sont pas détectables. Cette différence majeure s'explique par la nature des interactions à la base de ces techniques.

Dans la notation de Siegbahn (Figure 8), les raies d'émission sont notées par des lettres grecques indexées par ordre d'intensité décroissante. Ces lettres indiquent la transition électronique accompagnant la désexcitation.



### Notation de Siegbahn — notation générale

Couche de basse énergie	Couche de haute énergie	Préfixe de la raie
K ( $n = 1$ )	L ( $n = 2$ )	$K\alpha$
	M ( $n = 3$ )	$K\beta_1$
	N ( $n = 4$ )	$K\beta_2$
L ( $n = 2$ )	M ( $n = 3$ )	$L\alpha$
	N ( $n = 4$ )	$L\beta$
	O ( $n = 5$ )	$L\gamma$
M ( $n = 3$ )	N ( $n = 4$ )	$M\alpha$
	O ( $n = 5$ )	$M\beta$

**Figure 8.** Excitation et désexcitation d'un atome et correspondance entre le nom de quelques raies et les niveaux en question.

## II.5 La fluorescence X

G. Sagnac découvrit en décembre 1896 le rayonnement de fluorescence X à la Sorbonne et c'est dans son laboratoire privé que M. de Broglie réalisa en mai 1914 le premier spectre de fluorescence X par dispersion de longueur d'onde [140-142].

La fluorescence X est une technique d'analyse élémentaire, c'est-à-dire qu'elle permet d'identifier les différents éléments présents au sein du matériau, y compris les éléments présents à l'état de trace. En éclairant notre échantillon avec des photons de haute énergie, des électrons de cœur du cortège électronique de l'atome sont éjectés [143]. L'atome est ainsi

placé dans un état excité. Pour revenir à son état initial, le cortège électronique de l'atome se réarrange :

- soit par un mode non radiatif, correspondant à une émission d'électrons, c'est l'effet Auger ;

- soit par un mode radiatif associé à une émission d'autres photons.

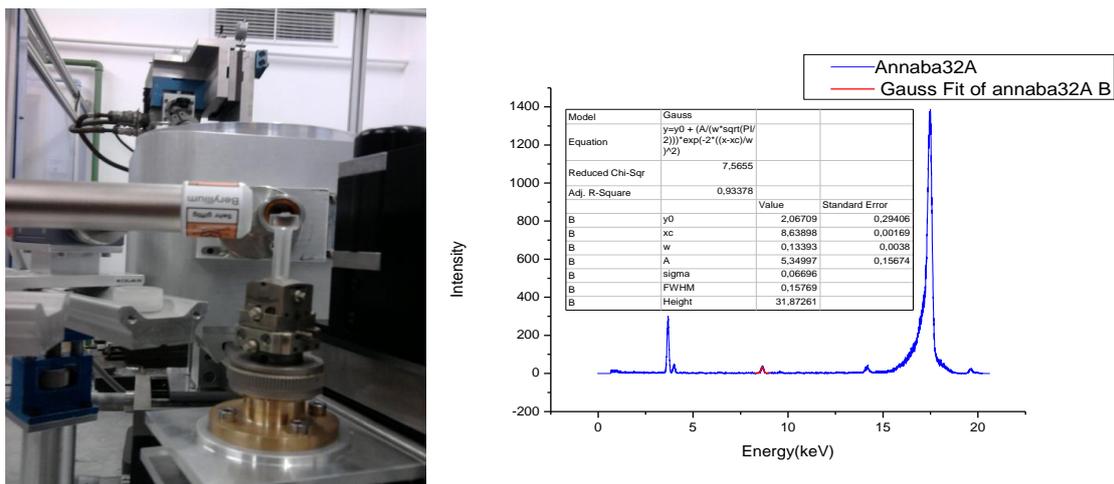
La fluorescence X se réfère à la voie radiative. La fluorescence dite primaire résulte directement de l'effet sur l'élément considéré du rayonnement primaire incident. Elle constitue donc la contribution principale à l'émission d'un élément dans un échantillon [144]. La fluorescence d'un des éléments de l'échantillon, excité par le faisceau incident, peut (si elle est assez énergétique) jouer à son tour le rôle de faisceau incident "excitateur" sur un autre élément de l'échantillon, et donc provoquer une fluorescence secondaire. Dans cette configuration, il est possible d'être confronté à un renforcement de l'intensité d'un élément.

Le retour de l'atome dans son état initial est un processus complexe qui dépend notamment du numéro atomique de l'élément et qui met en jeu plusieurs électrons du cortège électronique de l'atome. Il existe ainsi différentes désexcitations électroniques. Chacune d'elles est associée à l'émission de photons dont l'énergie est spécifique à cette désexcitation. On observe donc non pas des photons d'une seule énergie mais un ensemble de photons d'énergies différentes. Chaque énergie définit une raie d'émission caractéristique de l'élément présent dans le matériau. C'est l'analyse de cette collection de raies dénommée spectre d'émission qui permet de savoir quels sont les éléments présents au sein du matériau. L'énergie de la raie d'émission permet de connaître le numéro atomique de l'élément.

L'analyse quantitative n'est pas basée sur une simple mesure des aires des raies de fluorescence X. En effet, Friedmann et Birks ont montré que l'intensité de fluorescence X d'un élément n'est pas directement proportionnelle à la concentration [145]. Cette apparente contradiction est induite par des effets de matrice [146]. Comme le présente N. Broll [147], plusieurs méthodes d'analyse quantitative ont été testées avec succès, dont la mise en œuvre de composés étalons ou l'utilisation de la diffusion Compton comme standard interne. Toutes ces approches ne sont pas aussi fiables que celles basées sur les équations fondamentales de la fluorescence X traitées initialement par Von Hamos [148]. On se reportera aux travaux de Shiraiwa et Fujino [149] pour en avoir une expression correcte. Désormais, l'analyse quantitative s'effectue notamment par le biais de logiciels performants [150]. Soulignons que dans le cas des calculs urinaires où l'on s'attache à déterminer la nature d'éléments « lourds »

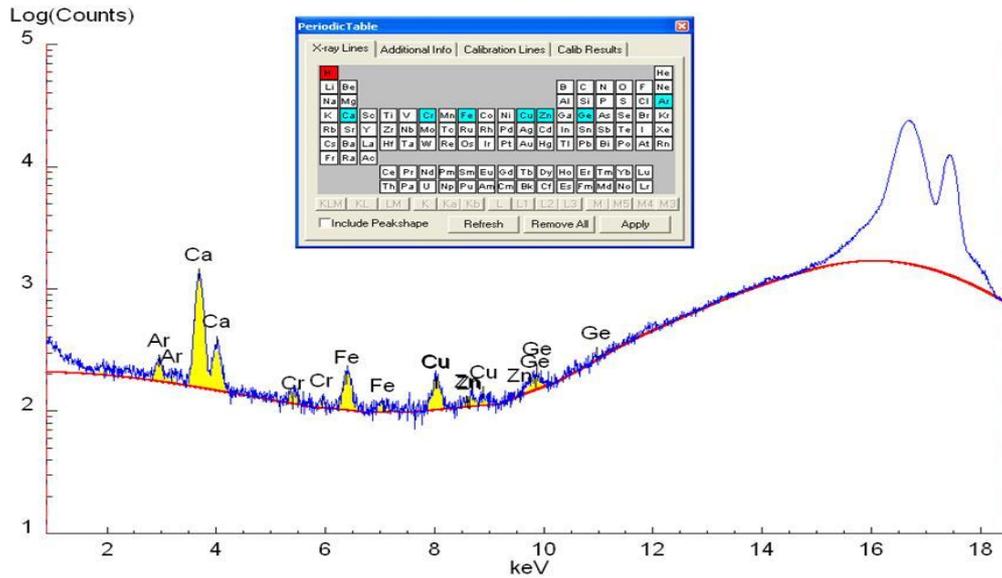
comme le zinc dans une matrice « légère » contenant toutefois des atomes de calcium, des analyses précises peuvent s'effectuer sans correction [151].

Deux dispositifs expérimentaux ont été mis en œuvre : Le premier montage est implanté au Laboratoire de Physique des Solides à Orsay (Figure 9), le second est une source portable localisée au CEA-Saclay (Figure 10). Pour le premier montage, le faisceau des rayons X de diamètre de 1 mm vient éclairer un échantillon placé sur un support dont la position est pilotée par ordinateur. Les photons de fluorescence sont collectés sur un détecteur refroidi par effet Peltier. Les données sont exploitées par le logiciel Origin 8.0 afin d'évaluer les concentrations des éléments.



**Figure 9.** Montage classique pour la fluorescence X localisé au LPS et spectre de fluorescence X tracé sous le logiciel Origin

La source portable est dotée d'un logiciel qui évalue les éléments traces et donne directement les concentrations sous format de tableaux Excel.



**Figure 10.** Exemple de spectre de Fluorescence X donné par le dispositif associé à la source portable.

De nombreux travaux soulignent l'importance des éléments traces dans différents contextes biologiques [152-154]. Les travaux inhérents aux calculs urinaires (on inclut ici la fluorescence X induite par les protons) [155-171] ou aux cristaux synthétiques [172-178] sont aussi nombreux et se focalisent sur le rôle éventuel des éléments traces sur la cinétique de croissance de différentes phases chimiques présentes dans les calculs ou encore sur l'influence de ces éléments traces sur la morphologie [179]. L'ensemble de ces travaux se contente généralement d'établir une liste plus ou moins exhaustive selon les conditions expérimentales des éléments (majeurs ou éléments traces) présents au sein de calcifications physiologiques ou pathologiques. Dans un article récent, une classification plus pertinente basée certes sur leur quantité mais surtout sur leur origine biologique a été proposée [12,180].

Précisant les conditions expérimentales (l'énergie des photons détectés est comprise entre 2 et 18 KeV), cette classification repose sur un jeu d'une centaine de calcifications pathologiques et distingue en premier lieu les éléments présents dans la formule stœchiométrique du calcul donnant lieu à un signal de fluorescence mesurable. Ainsi nous observons les contributions du calcium ( $EK_{\alpha} = 3.692$  KeV,  $EK_{\beta} = 4.013$  KeV) dans le cas de calculs formés de whewellite :  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , de weddellite :  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ou encore de carbapatite et le soufre ( $EK_{\alpha} = 2.308$  KeV,  $EK_{\beta} = 2.464$  KeV) pour les calculs formés de cystine ( $[\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]_2$ ).

On trouve ensuite des éléments traces d'origines très différentes. Ainsi le strontium ( $E_{K_{\alpha}} = 14.17 \text{ KeV}$ ,  $E_{K_{\beta}} = 15.84 \text{ KeV}$ ) et le sélénium ( $E_{K_{\alpha}} = 1.22 \text{ KeV}$ ,  $E_{K_{\beta}} = 12.50 \text{ KeV}$ ) sont présents en raison notamment du fait que ces éléments partagent la même colonne du tableau périodique que des éléments majoritaires (le strontium pour le calcium, le sélénium pour le soufre) et donc sont associés à la même chimie. On peut aussi souligner le fait que le  $\text{Sr}^{2+}$  suit les mêmes voies métaboliques que le  $\text{Ca}^{2+}$  et qu'il s'y substitue dans un ensemble de composés comme l'apatite [181].

Pour le zinc ( $E_{K_{\alpha}} = 8.64 \text{ KeV}$ ,  $E_{K_{\beta}} = 9.57 \text{ KeV}$ ) et le cuivre ( $E_{K_{\alpha}} = 8.04 \text{ KeV}$ ,  $E_{K_{\beta}} = 8.90 \text{ KeV}$ ), ces deux éléments sont présents dans de nombreuses métalloprotéines. A noter le fait que le zinc est éliminé par le rein, mais que sa concentration dans l'urine est faible, de l'ordre de 0,1 ppm, alors qu'elle est sensiblement plus élevée dans le parenchyme en moyenne 20-30 ppm [182,183]. La présence du Fer fait probablement suite à des saignements.

Une autre famille d'éléments traces est occasionnellement retrouvée, cette fois-ci de manière pathologique, il s'agit du plomb et du cadmium qui sont deux néphrotoxiques bien connus. Notons que la teneur en plomb des milieux biologiques d'origine humaine, en particulier le sang, qui peut s'expliquer par une exposition chronique, notamment au travers de conduites d'eau potable en plomb, a diminué de manière significative en France lors de ces deux dernières décennies [184].

Enfin, des éléments lourds à visée thérapeutique comme l'iode [185] ou le platine [186] constituent la dernière famille d'éléments présents au sein des calculs rénaux. La présence d'iode a été relevée dans au moins un cas. Notons aussi la présence, encore inexpliquée, du brome.

Cet ensemble de résultats permet d'aborder l'une des controverses associées aux éléments traces, celle associée au rôle catalytique des éléments traces dans la pathogenèse des calculs urinaires. Nous nous limiterons ici au phosphate de calcium de structure apatitique. Lorsqu'ils sont synthétisés en milieu basique, les phosphates de calcium amorphes ne contiennent généralement pas de groupement phosphate acide et présentent la composition du phosphate tricalcique [187], avec un rapport atomique Ca/P proche de 1,5. Différentes investigations montrent que le magnésium, et le carbonate jouent un rôle essentiel dans la stabilisation du phosphate de calcium amorphe dans les milieux biologiques [121,187-189] tout en inhibant la croissance cristalline de la phase apatitique [190]. Notons que les ions fluorures favorisent la conversion de la phase amorphe en apatite [187]. D'autres paramètres physico-chimiques comme le pH sont susceptibles d'influencer la conversion de la phase amorphe en apatite, phosphate octocalcique et/ou brushite. Ainsi cette conversion est

favorisée en milieu acide alors qu'en milieu basique la phase amorphe est au contraire stabilisée [121].

Ces résultats dévoilent que le zinc ne joue pas de rôle catalytique dans la formation d'un calcul et de ce fait les éléments traces ne peuvent être considérés comme des facteurs de risque. Sur le plan physicochimique, leur teneur s'explique par leur présence naturelle dans le corps humain (à titre indicatif, un corps humain de 70 Kg contient 1 Kg de Ca, 19g de Mg, 4-5g de Fer, 2-3 g de Zn). De plus, l'affinité des éléments traces pour les différentes phases chimiques constitutives du calcul suit les règles de Goldschmidt qui reposent sur la charge et le rayon ionique, la force de liaison et l'électronégativité [191]. En effet, les rayons atomiques associés à ces deux cations bivalents sont très proches ( $R(\text{Ca}^{2+}) = 0.99 \text{ \AA}$ ;  $R(\text{Zn}^{2+}) = 0.74 \text{ \AA}$ ). On remarque alors que dans les études de Bazin et coll. [12,180], la teneur moyenne en zinc des calculs variait selon leur contenu en calcium et selon la phase cristalline riche en calcium qui était présente. Ainsi, dans les calculs d'oxalate de calcium, la teneur en zinc était plus faible dans les calculs de whewellite (en moyenne 42 ppm) que dans ceux de weddellite (environ 290 ppm) et elle était beaucoup plus élevée dans les calculs de phosphates de calcium, en particulier de carapatite (en moyenne 1059 ppm) [12].

## II.6 La diffraction des neutrons.

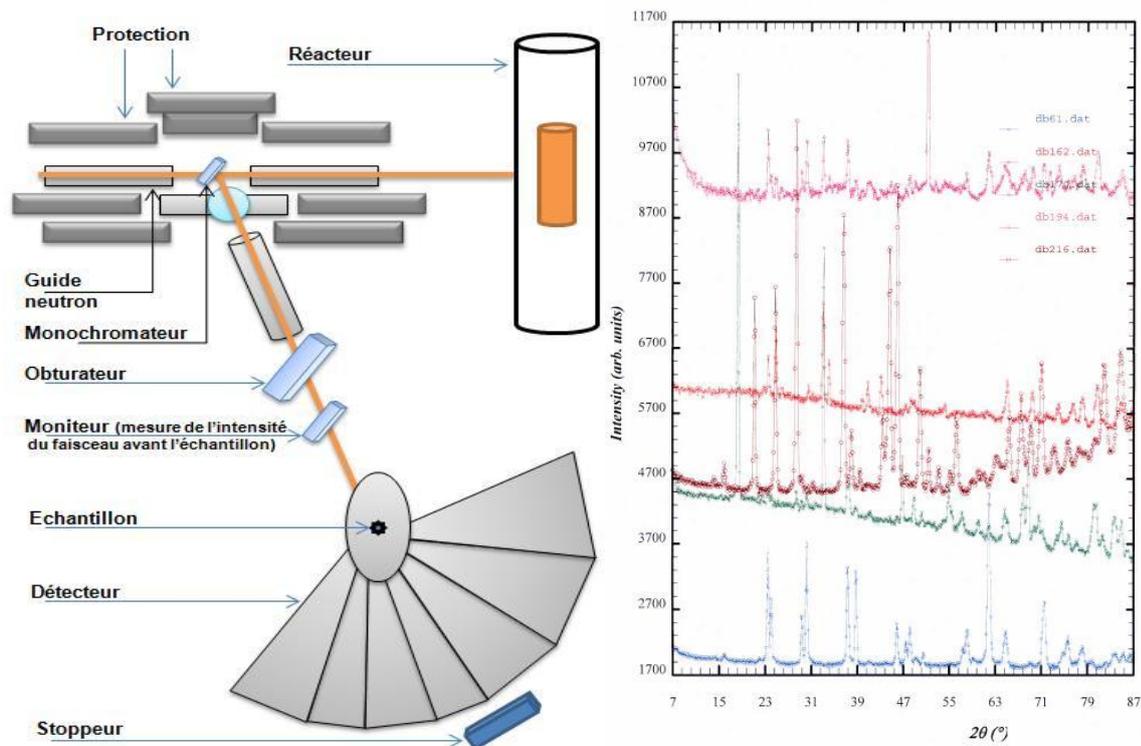
En physique, en chimie et en science des matériaux, la mise en œuvre des sondes que constituent les faisceaux de photons, d'électrons ou de neutrons pour étudier la matière utilise le fait que la matière va émettre une réponse à cette excitation. Parmi les réponses, le phénomène de diffusion, qui s'associe à une onde diffractée, résulte d'une combinaison d'ondes cohérentes (même énergie et même phase) diffusées par chacun des atomes qui interfèrent. L'analyse de l'intensité du faisceau émergent généré permet la description de l'agencement des atomes au sein de l'échantillon [7-9]. Une fois connues les structures cristallographiques des phases chimiques présentes, on peut accéder à la composition chimique de l'échantillon.

En ce qui concerne la diffraction neutronique ou PND (Powder Neutron Diffraction), elle constitue une technique non-destructive. L'établissement du diagnostic médical s'effectuant sur l'ensemble du calcul [192,193], il est essentiel de mesurer la taille moyenne des nanocristaux composant le calcul en prenant en compte l'ensemble de la masse du calcul (de dimension millimétrique) sans altérer son intégrité physico-chimique. Les diagrammes de diffraction collectés indiquent alors (par le biais des largeurs des raies de diffraction) la

dimension des nanocristaux. Deux caractéristiques de nos échantillons font de la PND un outil particulièrement adapté : la première est la présence de phases chimiques majoritairement constituées d'éléments légers (H,O,N,C) et la seconde est le fait que la mesure de la taille des nanocristaux peut s'effectuer sur l'ensemble de l'échantillon. L'excellente qualité des données obtenues au laboratoire Léon Brillouin [194] nous a permis d'effectuer une analyse quantitative en utilisant la méthode de Rietveld [195-198], le logiciel mis en œuvre étant FULLPROF [199-202].

Des expériences de diffraction neutronique ont été mises en œuvre précédemment pour des calculs d'oxalate de calcium monohydraté [116], d'acide urique [180], d'apatite [131], de struvite [132] et pour des calculs de cystine [203]. Parmi toutes ces phases chimiques, les cristaux d'apatite sont caractérisés par les plus petites tailles. L'ensemble de ces expériences de diffraction neutronique a permis de montrer que le polymorphisme des oxalates de calcium monohydraté en relation avec la pathologie ne s'exprime pas à l'échelle nanométrique. De plus, une explication basée sur la taille des cristaux a été proposée pour rendre compte de l'absence d'empreintes de bactéries à la surface de calculs de struvite. Enfin, nous avons pu aborder le mode d'action de différents médicaments dans le cas du traitement médical de la cystinurie. En ce qui concerne les calculs de l'Est Algérien, les mesures ont été réalisées et sont en cours sur une plus grande série de calculs.

Les diagrammes de diffraction neutronique ont été collectés sur la station expérimentale G4.1 (Figure 11) [204] implémentée sur la source froide du réacteur Orphée (Saclay, France), qui fait partie du laboratoire Léon Brillouin [196]. Ce dispositif est équipé d'un monochromateur en graphite pyrolytique et d'un multidétecteur deux axes comprenant 800-cellules couvrant un angle de  $80^\circ$  en  $2\theta$  (pas de  $0.1^\circ$  entre 2 cellules). Dans notre cas, les diagrammes sont collectés entre  $2\theta = 7$  et  $87^\circ$ , la longueur d'onde étant égale à  $2.4226 \text{ \AA}$ . Le temps d'acquisition est de l'ordre de quelques heures, les mesures s'effectuant à température et pression ambiantes. Ce dispositif particulièrement ingénieux permet de mesurer avec une grande précision des cristaux dont la taille oscille entre 5 et 200 nanomètres.

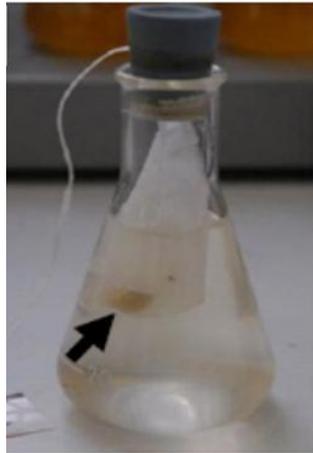


**Figure 11.** Montage de diffraction neutronique G4.1 et diagrammes de diffraction neutronique

## II.7 Étude de l'effet de dissolution des plantes sur les calculs rénaux

Nous avons choisi trois types de calculs résistant à la lithotripsie : l'oxalate de calcium type Id, la cystine et la brushite. Ces types de calculs sont souvent difficiles à traiter et à prévenir par les procédures urologiques et médicales actuellement disponibles. L'oxalate de calcium type Id traduit des situations de stase avec confinement anatomique (obstruction, anomalies anatomiques post-papillaires, diverticules caliciels). La cystinurie est une affection autosomique récessive à l'origine d'une aminoacidurie responsable de la maladie lithiasique [205]. Bien que la prévalence de la cystinurie soit relativement faible en comparaison d'autres formes de lithiase, il est nécessaire de reconnaître précocement la maladie et de mettre en œuvre un traitement urologique et médical préventif car c'est une forme très récidivante de lithiase avec un risque d'altération de la fonction rénale. Finalement, la brushite, classée parmi les calculs phosphocalciques, est également une forme très récidivante qui a considérablement progressé chez la femme dans les pays industrialisés, notamment en France, passant de 0,4 à 1% ( $p < 0,05$ ) en quelques décennies.

Pour étudier l'influence des plantes sur les différents types de calculs, nous avons préparé un extrait de chaque plante par infusion, pendant 30 minutes, de 3 g de plante sèche dans 100 ml de solution physiologique bouillante (9 g de NaCl par litre), la solution de NaCl de 9 g/L étant utilisée par ailleurs comme milieu témoin pour apprécier les modifications de masse et/ou de structure des calculs [206]. Après filtration, l'extrait a été reparti (60 ml) dans des erlenmeyers en verre (Figure 12).



**Figure 12.** Calcul de cystine incubé dans une solution témoin de NaCl 9g/litre

Le calcul a été placé dans un sachet poreux en fibres tressées afin d'éviter tout contact avec le barreau magnétique et mis en suspension dans l'extrait. Ainsi, les calculs rénaux ont été isolés de tout effet mécanique. Chaque extrait a été mis sous agitation magnétique constante de 130 t/min pendant plusieurs semaines. Pour chaque expérience, le pH de la solution a été mesuré tous les 15 jours à l'aide d'un pH-mètre et la perte de masse des calculs rénaux évaluée par pesée du calcul après séchage dans une étuve à 40°C pendant 18 heures. Un suivi de l'état de la surface a été effectué par MEB [207,208]. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. Le traitement statistique des données a été effectué avec le logiciel NCSS (NCSS statistical package, J. Hintz, Gainesville, FL).

Les plantes médicinales évaluées contre la lithiase d'oxalate de calcium type Id étaient : *Ammi visnaga*, racines non traitées de *Madélithiol IMRA 2000*, et racines de *Madélithiol IMRA 2000* délipidées par  $\text{CHCl}_3$ . Les plantes médicinales évaluées contre la lithiase de cystine étaient : *Arenaria ammophila* (tiges et feuilles), les feuilles de *Parietaria officinalis*, les fleurs de *Parietaria officinalis*, et les fleurs de *Paronychia Argentea*. Le pH de la solution a été mesuré tous les 15 jours à l'aide d'un pH-mètre.

Les plantes médicinales testées contre la lithiase de brushite sont : les fleurs de *Paronychia Argentea*, les fleurs de *Parietaria officinalis*, *Arenaria ammophila* (tiges et feuilles) et Ammi Visnaga. Un extrait de chaque plante a été préparé par infusion et une seule solution témoin a été utilisée (la solution physiologique). Le pH de la solution a été mesuré tous les 15 jours à l'aide d'un pH-mètre.

## Références

- [1] D. Bazin, M. Daudon, P. Chevallier, S. Rouzière, E. Elkaim, D. Thiaudière, B. Fayard, E. Foy, P. A. Albouy, G. André, G. Matzen, E. Véron, Les techniques de rayonnement synchrotron au service de la caractérisation d'objets biologiques : un exemple d'application, les calculs rénaux, *Annales de Biologie Clinique* 2006 ; 64 : 125 - 136.
- [2] M. Daudon, D. Bazin, New techniques to characterize kidney stones and Randall's plaque in Urolithiasis : Basic Science and Clinical Practice" (Eds.) J.J. Talati, H.G. Tiselius, D.M. Albala, Z. Ye, Springer, London 2012, pp.683-707.
- [3] K.M. Kim, The stones, *Scan. Elect. Micros.* 1982 ; 4 : 1635 - 1660.
- [4] R.L. Ryall, D.E. Fleming, I. R. Doyle, N.A. Evans, C.J. Dean, V. R. Marshall Intracrystalline proteins and the hidden ultrastructure of calcium oxalate urinary crystals : implications for kidney stone formation, *J. of Structural Biology* 2001 ; 134 : 5 - 14.
- [5] S.R. Khan, B.K. Canales, Ultrastructural Investigation of Crystal Deposits in Npt2a Knockout Mice : Are They similar to human Randall's plaques? *The Journal of Urology* 2011 ; 186 : 1107 - 1113.
- [6] X. Carpentier, M. Daudon, O. Traxer, P. Jungers, A. Mazouyes, G. Matzen, E. Véron, D. Bazin, Relationships between carbonation rate of carbapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology, *Urology*, 2009 ; 73 : 968 - 975.
- [7] A. Guinier, *Théorie et technique de la radiocristallographie*; Dunod: Paris, 1964.
- [8] H.M. Rietveld, A profile refinement method for nuclear and magnetic structure, *J. Appl. Cryst.* 1969 ; 2 : 65 -71.
- [9] A. Le Bail, D. Louër, Smoothing and validity of crystallite size distributions from X-ray line profile analysis, *J. Appl. Cryst.* 1978 ; 11 : 50 - 55.
- [10] A.N. Primak, J.G. Fletcher, T.J. Vrtiska, O. P. Dzyubak, J.C. Lieske, M.E. Jackson, J.C. Williams Jr, C. H. McCollough, Noninvasive differentiation of uric acid versus non-uric acid kidney stones using dual-energy CT, *Academic Radiology* 2007 ; 14 : 1441 - 1447.
- [11] R. Jenkins, X-ray Fluorescence Analysis, *Anal. Chem.* 1984 ; 56 : 1099A - 1106A
- [12] D. Bazin, P. Chevallier, G. Matzen, P. Junger, M. Daudon, Heavy elements in urinary Stones, *Urol Res* 2007 ; 35 : 179-184.
- [13] X. Carpentier, D. Bazin, Ch. Combes, A. Mazouyes, S. Rouzière, P. A. Albouy, E. Foy, M. Daudon, High Zn content of Randall's plaque: A  $\mu$ -X-ray fluorescence investigation, *J. of Trace El. in Med. and Biol.* 2011 ; 25 : 160 - 165.
- [14] C.A. Pineda-Vargas, M.E.M. Eisa, A.L. Rodgers, Characterization of human kidney stones using micro-PIXE and RBS: A comparative study between two different populations, *App. Rad. and Isotopes* 2009 ; 67 : 464 - 469.
- [15] M.A.B. Pougnet, M. Peisach, A.L. Rodgers, The application of a combined PIXE and XRD approach to the analysis of human stones, *NIM B* 1988 ; 35 : 472 - 477.
- [16] L. Estepa, M. Daudon, Contribution of F.T. infrared spectroscopy to the identification of urinary stones and kidney crystal deposits. *Biospectroscopy* 1997 ; 3 : 347 - 369.
- [17] L. Maurice-Estepa, P. Levillain, B. Lacour, M. Daudon, Advantage of zero-crossing point first-derivative spectrophotometry for the quantification of calcium oxalate crystalline phases by infrared spectrophotometry. *Clin Chim Acta.* 2000 ; 298 : 1 - 11.
- [18] Quy-Dao N, Daudon M (1997) *Infrared and Raman Spectra of Calculi*. Ed. Elsevier.
- [19] M. Daudon, Comment analyser un calcul et comment interpréter le résultat. *L'Eurobiologiste*, 1993 ; 27 : 35 - 46.
- [20] L. Maurice-Estepa, P. Levillain, B. Lacour, M. Daudon, Crystalline phase differentiation in urinary calcium phosphate and magnesium phosphate calculi, *Scand J Urol Nephrol* 1999 ; 33 : 299 – 305.
- [21] S.D. Blaschko, J. Miller, Th. Chi, L. Flechner, S. Fakra, A. Kahn, P. Kapahi, M. L. Stoller, Microcomposition of Human urinary calculi using advanced imaging techniques, *The Journal of Urology*, 2013 ; 189 : 726 - 734.
- [22] S. D. Blaschko, Th. Chi, J. Miller, L. Flechner, S. Fakra, P. Kapahi, A. Kahn, M. L. Stoller, Sr substitution for calcium in lithogenesis, *J. of Urology* 2013 ; 189 : 735 - 739.
- [23] A.I. Ancharov, A.I. Nizovskii, S.A. Gridnev, An attempt of in vivo X-ray diffraction analysis of kidney stones with the use of S.R. Nuclear Instr. Meth. A 2005 ; 543 : 302 - 305.
- [24] P.M. Bertsch, D.B. Hunter, Applications of synchrotron-based X-ray microprobes, *Chem. Rev.*, 2001 ; 101 : 1809 - 1842.
- [25] R. Rodriguez-Carvajal, Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction. *Phys B.* 1993 ; 192 : 55 - 69.
- [26] D. Bazin, D.A. Sayers, J.J. Rehr, Comparison between Xas, Awaxs, Asaxs & Dafs

- applied to nanometer scale metallic clusters, *J. Phys. Chem. B* 1997 ; 101 : 11040 - 11047.
- [27] D. Bazin, L. Guzzi, J. Lynch, Awaax and heterogeneous catalysts. *App. Cat. A* 2002 ; 226 : 87 - 113.
- [28] P. Philippot, B. Menez, P. Chevallier, F. Gibert, F. Legrand, P. Populus, Absorption correction procedures for quantitative analysis of fluid inclusions using S.R. X-ray fluorescence, *Chemical Geology*, 1998 ; 144 : 121 - 136.
- [29] P. Chevallier, P. Dhez, A. Erko, A. Firsov, F. Legrand, P. Populus, Hard X-ray microbeam production and application. *Nuclear Instr. Meth. B* 1996 ; 113 : 122 - 127.
- [30] P. Chevallier, P. Dhez, F. Legrand, A. Erko, Y. Agafonov, L.A. Panchenko, A. Yakshin, The LURE-IMT X-ray fluorescence photon microprobe. *J. Trace Micro. Tech.* 1996 ; 14 : 517 - 539.
- [31] P. Chevallier, I. Brissaud, J.X. Wang, Quantitative analysis by S.R. induced X-ray fluorescence at Lure, *Nuclear Instr. Meth. B*: 1990 ; 49 : 551 - 554.
- [32] F. Legrand, 1995. Mise au point d'une microsonde par fluorescence X excitée par le rayonnement synchrotron. Ph.D. Thesis, Université de Paris-Sud.
- [33] P. Chevallier, P. Dhez, A. Erko, A. Firsov, F. Legrand, P. Populus, X-ray microprobes, *Nuclear Instr. Meth. B* 1996 ; 113 : 122 - 127.
- [34] N. Jamin, P. Dumas, J. Moncuit, W.H. Fridman, J.L. Teillaud, G.M. Carr, G.P. Williams, Highly resolved chemical imaging of living cells by using S.R. infrared microspectrometry, *Proc. Natl. Am.Soc.* 1998 ; 95 : 4837 - 4840.
- [35] P. Dumas, N. Jamin, J.L. Teillaud, L.M. Miller, B. Beccard, Imaging capabilities of synchrotron infrared microspectroscopy. *Faraday Discuss.* 2004 ; 126 : 289 - 302.
- [36] A. Dessombz, D. Bazin, P. Dumas, Ch. Sandt, J. Sule-Suso, M. Daudon, Shedding light on the chemical diversity of ectopic calcifications in Kidney Tissues : Diagnostic & Research Aspects, *PLoS ONE* 2011 ; 6 : e28007 – e28010.
- [37] F. Le Naour, Ch. Sandt, C. Peng, N. Trcera, F. Chiappini, A.-M. Flank, C. Guettier, P. Dumas, In Situ Chemical composition analysis of cirrhosis by combining R.S.- F.T. infrared and S.R. X-ray Fluorescence Microspectroscopies on the Same Tissue Section, *Anal. Chem.*, 2012 ; 84 : 10260 - 10266.
- [38] F.W. Lytle, D.A. Sayers, E.A. Stern, Extended x-ray-absorption fine-structure technique. II. Experimental practice and selected results, *Phys. Rev. B* 1975 ; 11 : 4825 - 4835.
- [39] E.A. Stern, D.E. Sayers, F.W. Lytle, Extended x-ray-absorption fine-structure technique. III. Determination of physical parameters, *Phys. Rev. B* 1975 ; 11 : 4836 - 4846.
- [40] S. Benazeth, D. Bazin, B. Viossat et al., Anti tumor design Pt(II) compounds, derived from ellipticine and its analogs, *J. de Chimie Physique et de Physico Chimie Biologique* : 1989 ; 86 : 1635 - 1642.
- [41] D. Bazin, X. Carpentier, I. Brocheriou, P. Dorfmueller, S. Aubert, Ch. Chappard, D. Thiaudière, S. Reguer, G. Waychunas, P. Jungers, M. Daudon, Revisiting the localisation of Zn<sup>2+</sup> cations sorbed on pathological apatite calcifications made through X-ray absorption spectroscopy, *Biochimie* 2009 ; 91 : 1294 - 1300.
- [41] X. Carpentier, D. Bazin, P. Jungers, S. Reguer, D. Thiaudière, M. Daudon, The pathogenesis of Randall's plaque: a papilla cartography of Ca compounds through an ex vivo investigation based on XANES spectroscopy *J. of Syn. Rad.* 2010 ; 7 : 374 - 379.
- [42] Ch. Nguyen, H.-K. Ea, D. Thiaudière, S. Reguer, M. Daudon, D. Bazin, Calcifications in human osteoarthritic articular cartilage: ex vivo assessment of calcium compounds using XANES spectroscopy, *J. of Syn. Rad.* 2011 ; 18 : 475 - 480.
- [43] D. Bazin, M. Daudon, Ch. Chappard, J.J. Rehr, D. Thiaudiere, S. Reguer, The status of strontium in biological apatites: an XANES investigation, *J. of Syn. Rad.* 2011 ; 18 : 912 - 920.
- [44] Current events, *J. Synchr. Rad.* 2007 ; 14 : 297 - 298.
- [45] D. Bazin, X. Carpentier, O. Traxer, D. Thiaudière, A. Somogyi, S. Reguer, G. Waychunas, P. Jungers, M. Daudon, Very first tests on SOLEIL regarding the Zn environment in pathological calcifications made of apatite determined by X-ray absorption spectroscopy, *J. Syn. Rad* 2008 ; 15 : 506 - 509.
- [46] Herschel, W. and Dreyer, J.L.E. (1912) *The Scientific Papers of Sir William Herschel*, Royal Society and Royal Astronomical Society, London.
- [47] J. Lecomte, *Le rayonnement infrarouge*, Ed. Gauthier-Villiar, 1948.
- [48] A.D. Cross, *Introduction to practical infra red spectroscopy*, Ed. Butterworths, 1960.
- [49] J. Chamberlain, *The principles of interferometric spectroscopy*, Ed. Wiley, 1979.
- [50] <https://cours.espci.fr/site.php?id=26&fileid=689>
- [51] P.R. Griffiths, J.A. Haseeth, *Fourier transform infrared spectroscopy in chemical analysis: a series of monographs on analytical chemistry and its applications*. Ed. Wiley 1986; 38.
- [52] M. Essendoubi, Docteur de l'université de Reims Champagne-Ardenne, Identification et

- typage par  $\mu$ spectroscopie IRTF des levures du genre *Candida* d'origine clinique, 2007.
- [53] G.L. Carr, "Resolution limits for infrared microspectroscopy explored with synchrotron radiation Rev. Sci. Instrum. 2001 ; 72 : 1613 - 1619.
- [54] G.P. Williams, Infrared synchrotron radiation instrumentation and applications, Rev. Sci. Instrum. 1992 ; 63 : 1535 - 1545.
- [55] G.L. Carr, J.A. Reffner, G.P. Williams, Performance of an infrared microspectrometer at the NSLS, Rev. Sci. Instrum. 1995 ; 66 : 1490 - 1492.
- [56] J.A. Reffner, P.A. Martoglio, G.P. Williams, F.T. infrared microscopical analysis with synchrotron radiation: the microscope optics and system performance, Rev. Sci. Instrum. 1995 ; 66 : 1298 - 1310.
- [57] F. Baudelet, Des synchrotrons et 100 ans d'histoire, sous presse.
- [58] <http://www.lightsources.org/cms/>
- [59] <http://www.synchrotron-soleil.fr/>
- [60] R.M. Slayton, P.A. Anfirud, Time-resolved mid-infrared spectroscopy: methods and biological applications, Curr. Opin. Struct. Biol. 1997 ; 7 : 717 - 721.
- [61] G.L. Carr, High-resolution microspectroscopy and sub-nanosecond time resolved spectroscopy with the synchrotron infrared source, Vib. Spectrosc. 1999 ; 19 : 53 - 60.
- [62] L.M. Miller, G.D. Smith, G.L. Carr, Synchrotron-based biological microspectroscopy: From the mid-infrared through the far-infrared regimes, J. Biol. Phys. 2003 ; 29 : 219 - 230.
- [63] P. Dumas, L. Miller, The use of synchrotron infrared microspectroscopy in biological and biomedical investigations, Vib. Spectrosc. 2003 ; 32 : 3 - 21.
- [64] P. Dumas, G.D. Sockalingum, J. Sulé-Suso, Adding synchrotron radiation to infrared microscopy : what's new in biomedical applications, Trends in biotechnology 2006 ; 25 : 40 - 44.
- [65] P. Dumas, F. Polack, B. Lagarde, O. Chubar, J.L. Giorgetta, S. Lefrançois, Syn. I.R. microscopy at the French synchrotron Facility SOLEIL, Infrared Physics & Technology 2006 ; 49 : 152 - 160.
- [66] L.M. Miller, P. Dumas, Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light, Biochimica et Biophysica Acta, 2006 ; 1758 : 846 - 857.
- [67] L.M. Miller, M.J. Tobin, S. Srichan, P. Dumas, About the use of synchrotron radiation in infrared microscopy for biomedical applications. In Biomedical Applications of FTIR Spectroscopy, Edited by P. Haris IOS Press; 2008.
- [68] M.C. Martin, U. Schade, Ph. Lerch, P. Dumas, Recent applications and current trends in analytical chemistry using synchrotron-based Fourier-transform infrared microspectroscopy, Trends in Analytical Chemistry, 2010 ; 29 : 453 - 463.
- [69] L.M. Miller, P. Dumas, From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy, Current Opinion in Structural Biology 2010 ; 20 : 649 - 656.
- [70] F. Draux, Analyse de la cellule tumorale et de son interaction avec un agent anticancéreux : approche biophotonique par microspectroscopie RAMAN et infra rouge, PhD, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2009.
- [71] C. Kendall, M. Isabelle, F. Bazant-Hegemark, J. Hutchings, L. Orr, J. Babrah, R. Baker, N. Stone, a Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics, Analyst 2009 ; 134 : 1029 - 1045.
- [72] K. Yano, S. Ohshima, Y. Gotou, K. Kumaido, T. Moriguchi, H. Katayama, Direct measurement of human lung cancerous and noncancerous tissues by fourier transform infrared microscopy: can an infrared microscope be used as a clinical tool? Anal Biochem 2000 ; 287 : 218 - 225.
- [73] S. Koljenovic, T.C. Bakker Schut, J.P. van Meerbeeck, A.P. Maat, S.A. Burgers, P.E. Zondervan, J. M. Kros, G.J. Puppels, 'Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue', J Biomed Opt, 2004 ; 9 : 1187 - 1197
- [74] P.D. Lewis, K.E Lewis, R. Ghosal, S. Bayliss, A.J. Lloyd, J. Wills, R. Godfrey, Ph. Kloer, L.A.J. Mur, Evaluation of FTIR Spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum, BMC Cancer. 2010; 10 : 640 - 646.
- [75] A.P. Oliveira, R.A. Bitar, L. Silveira, R.A. Zangaro, A.A. Martin, 'Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis', Photomed Laser Surg. 2006 ; 24 : 348 - 353.
- [76] R.A. Bitar, S. Martinho Hda, C.J. Tierra-Criollo, L.N. Zambelli Ramalho, M.M. Netto, A.A. Martin, Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier transform Raman spectroscopy, J Biomed Opt. 2006 ; 11 : 54001 - 54010.
- [77] R. Baker, P. Matousek, K.L. Ronayne, A.W. Parker, K. Rogers, N. Stone, Depth profiling of calcifications in breast tissue using picosecond Kerr-gated Raman spectroscopy, Analyst, 2007 ; 132 : 48 - 53.
- [78] R. Baker, K.D. Rogers, N. Shepherd, N. Stone, New relationships between breast microcalcifications and cancer, British J. of Cancer 2010 ; 5 : 1 - 6.

- [79] G. Shetty, C. Kendall, N. Shepherd, N. Stone, H. Barr, Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus, *Br. J. Cancer* 2006 ; 94 : 1460 -1464.
- [80] B. Rigas, S. Morgello, I.S. Goldman, P.T. Wong, Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990 ; 87 : 8140 - 8144.
- [81] M.J. Baker, E. Gazi, M.D. Brown, J.H. Shanks, P. Gardner, N.W. Clarke, FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer, *British J. of Cancer* 2008 ; 99 : 1859 - 1866.
- [82] M.J. Baker, E. Gazi, M.D. Brown, J.H. Shanks, N.W. Clarke, P. Gardner, Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer. *J. Biophotonics* 2009 ; 2 : 104 - 113.
- [83] F. Le Naour, Ch. Sandt, Ch. Peng, N. Trcera, F. Chiappini, A.-M. Flank, C. Guettier, P. Dumas, In situ chemical composition analysis of cirrhosis by combining synchrotron F.T. infrared and synchrotron X-ray fluorescence microspectroscopies on the same tissue section, *Anal. Chem.* 2012 ; 84 : 10260 - 10266.
- [84] D. Bazin, J.-Ph. Haymann, E. Letavernier, J. Rode, M. Daudon, Pathological calcifications : a medical diagnosis based on their physico-chemical properties, La presse médicale, sous presse.
- [85] M. Von Ardenne, Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen. *Z. Phys.* 1938 ; 109 : 553 - 572.
- [86] M. von Ardenne, Das Elektronen-Rastermikroskop. Praktische Ausführung. *Z. Tech. Phys.* 1938 ; 19 : 407 - 416.
- [87] D. McMullan : Scanning Electron Microscopy 1928 – 1965, *Scanning* 1995 ; 17 : 175 - 185.
- [88] K.C.A. Smith KCA, C.W. Oatley, The scanning electron microscope and its fields of Application, *Br. J. Appl. Phys.* 1955 ; 6 : 391 - 399.
- [89] V.A. Zworykin, J. Hillier, R.L. Snyder : A scanning electron microscope. *ASTM Bull.* 1942 ; 117 : 15 - 23.
- [90] F. Brisset, M. Repoux, J. Ruste, F. Grillon, F. Robaut, Microscopie électronique à balayage et Microanalyses, EDP Sciences, ISBN : 978-2-7598-0082-7.
- [91] F.C. Chrétien, J. Berthou, P.A. Driguez. Dégradation des DIU in utero en fonction du temps, le phénomène de calcification, étude radiocristallographique et au microscope électronique à balayage, *Gyn. Obstet. Fertil.* 2001 ; 30 : 1 - 13.
- [92] L.S. Paek, J.O. Tétrault-Paquin, S. St-Jacques, M. Nelea, M.A. Danino, Le microscope électronique à balayage environnemental est-il un outil pertinent pour l'analyse des capsules périprothétiques mammaires ? *Annales de chirurgie plastique esthétique* 2012 ; 14 : 13 - 55.
- [93] D. Mavrilas, A. Apostolaki, J. Kaposos, P.G. Koutsoukos, M. Melachrinou, V. Zolota, D. Dougenis, Development of bioprosthetic heart valve calcification in vitro and in animal models: morphology and composition, *J. of Crystal Growth* 1999 ; 205 : 554 - 562.
- [94] S.Y. Buchen, C.M. Cunanan, A. Gwon, J.I. Weinschenk III, L. Gruber, P.M Knight, Assessing intraocular lens calcification in an animal model, *J. of Cataract & Refractive Surgery* 2001 ; 27 : 1473-1484.
- [95] L. Werner, B. Hunter, S. Stevens, J. J.L. Chew, N. Mamalis, Role of silicon contamination on calcification of hydrophilic acrylic intraocular lenses, *Am. J. of Ophthalmology* 2006 ; 141 : 35 - 43.
- [96] M.-C. Chen, H.-F. Liang, Y.-L. Chiu, Y. Chang, H.-J. Wei, H.-W. Sung, A novel drug-eluting stent spray-coated with multi-layers of collagen and sirolimus, *J. of Controlled Release* 2005 ; 108 : 178 - 189
- [97] S. Weiss, A. Meissner, A. Fischer, Microstructural changes within similar coronary stents produced from two different austenitic steels, *J. of the mechanical behavior of biomedical materials* 2009 ; 2 : 210 - 216.
- [98] T. Hasebe, K. Murakami, S. Nagashima, Y. Yoshimoto, A. Ihara, M. Otake, R. Kasai, S. Kasuya, N. Kitamura, A. Kamijo, H. Terada, A. Hotta, K. Takahashi, T. Suzuki, Design for improved adhesion of fluorine-incorporated hydrogenated amorphous carbon on metallic stent: Three-layered structure with controlled surface free energy *Diamond & Related Materials* 2011 ; 20 : 902 - 906.
- [99] L. Lei, X. Liu, Y.-Y. Shen, J.-Y. Liu, M.-F. Tang, Z.-M. Wang, S.-R. Guo, L. Cheng, Zero-order release of 5 fluorouracil from PCL-based films featuring trilayered structures for stent application, *Eur. J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011 ; 78 : 49 - 57.
- [100] M. Rouprêt, M. Daudon, V. Hupertan, B. Gattegno, Ph. Thibault, O. Traxer, Can ureteral stent encrustation analysis predict urinary stone composition ? *Urology* 2005 ; 66 : 246 - 251.
- [101] M. Roupret, V. Hupertan, M. Daudon, S. Lebrun, Ph. Sebe, B. Gattegno, Ph. Thibault, O. Traxer, Intérêt de l'analyse morpho-constitutionnelle par spectrophotométrie infrarouge des incrustations des sondes double J pour la détermination indirecte de la composition des calculs urinaires, *Progrès en Urologie* 2005 ; 15 : 411 - 415.

- [102] O. Söhnel, F. Grases. Fine structure of calcium oxalate monohydrate renal calculi, *Nephron* 1993 ; 63 : 176 - 182.
- [103] T. Kodaka, K. Debari, T. Sano, M. Yamada. Scanning electron microscopy and energy- dispersive X-ray microanalysis studies of several human calculi containing calcium phosphate crystals". *Scanning Microscopy* 1994 ; 8 : 241 - 257.
- [104] J.C. Nickel, G. Reid, A.W. Bruce, Ultrastructural microbiology of infected urinary stone, *Urology* 1986 ; 28 : 512 - 515.
- [105] H.H. Dorian, P. Rez, G.W. Drach, Evidence for Aggregation in oxalate stone formation: atomic force and low voltage scanning electron microscopy, *J. Urol* 1996 ; 156 : 1833 - 1837.
- [106] M. Van Meerssche, J. Feneau-Dupont, Introduction à la Cristallographie et à la Chimie Structurale. Louvain, Ed. Cesson : Vander, 1973.
- [107] B.M. Oughton, P.M. Harrison, The crystal structure of hexagonal L-Cystine, *Acta Cryst.* 1959 ; 12 : 396 - 404.
- [108] S. Dahaoui, V. Pichon-Pesme, J. A. K. Howard, C. Lecomte, CCD charge density study on crystals with large unit cell parameters: the case of hexagonal L-cystine, *J. Phys. Chem. A* 1999 ; 103 : 6240 - 6250.
- [109] C. Sterling, Crystal-Structure Analysis of Weddellite,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (2-1-x)\text{H}_2\text{O}$ , *Acta Cryst.* 1965 ; 18 : 917 - 921.
- [110] V. Tazzoli, C. Domeneghetti, The crystal structures of whewellite and weddellite: re-examination and comparison, *American Min.* 1980 ; 65 : 327 - 334.
- [111] D. Nenow, L. Vitkov, Effect of the opposite directions on the crystal face upon the growth kinetics of weddellite, *J. of Cryst. Growth* 1977 ; 182 : 461 - 464.
- [112] G. Cocco, The structure of whewellite. *Atti della Accademia nazionale dei Lincei. Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali. Rendiconti. Serie ottava*, 1961 ; 31 : 292 - 298.
- [113] H.J. Arnott, E.G.F. Pautard, H. Steinbeink, Structure of calcium oxalate monohydrate. *Nature* 1965 ; 208 : 1197 - 1198.
- [114] S. Deganello, E.O. Piro, The crystal structure of calcium oxalate monohydrate (whewellite). *Neues Jahrbuch für Mineralogie, Monatshefte*, 1981 pp 81-88.
- [115] T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shimizu, T. Hatta, Re-investigation of the crystal structure of whewellite [ $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\text{H}_2\text{O}$ ] and the dehydration mechanism of caoxite [ $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ], *Mineralogical Magazine* 2005 ; 69 : 77 - 88.
- [116] M. Daudon, D. Bazin, P. Jungers, G. André, A. Cousson, P. Chevallier, E. Véron, G. Matzen, Opportunities offered by scanning electron microscopy, powder neutron diffraction in the study of whewellite kidney stones, *J. App. Cryst.* 2009 ; 42 : 109 - 115.
- [117] M. Daudon, P. Junger, D. Bazin, Peculiar Morphology of Stones in Primary Hyperoxaluria, *N. Engl. J. of Med.* 2008 ; 359 : 100.
- [118] D.W. Jones, J.A.S. Smith, The structure of brushite,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; *J. Chem. Soc.* 1962 ; 1414 - 1420.
- [119] N.A. Curry, D.W. Jones, Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate : a neutron – diffraction investigation, *J. Chem. Soc. A.* 1971 ; 5 : 3725 - 3729.
- [120] R.Z. LeGeros, Calcium phosphates in oral biology and medicine ; Karger; *Monographs in Oral Science*, 1991 ; 15 : 1 - 201.
- [121] M. Banu, Mise en formed'apatites nanocristallines : céramiques et ciments, Thèse de l'institut National Polytechnique, Toulouse, 2005.
- [122] M. Mathew, W.E. Brown, L.W. Schroeder, B. Dickens, Crystal structure of octacalcium bis(hydrogenophosphate) tetrakis (phosp) pentahydrate  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , *J. Cryst. Spectrosc. Res.* 1988 ; 18 : 235 - 250.
- [123] A.N. Kofina, P.G. Koutsoukos, Spontaneous precipitation of struvite from synthetic wastewater solutions, *Cryst Growth Des.* 2005 ; 5 : 489 - 496.
- [124] J. Prywer, A. Torzewska, Bacterially induced struvite growth from synthetic urine: Experimental and theoretical characterization of crystal morphology, *Crystal growth and Design* in press.
- [125] A. Whitaker, J.W. Jeffery, The crystal structure of Struvite,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , *Acta Cryst.* 1970 ; B26 : 1429 - 1440.
- [126] J. Prywer, A. Torzewska, T. Plocinski, Unique surface and internal structure of struvite crystals formed by *Proteus Mirabilis*, *Urol. Res.* 2012 ; 40 : 699 - 707.
- [127] J.C. Elliott, Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [128] T.J. White, Dong ZhiLi, Structural derivation and crystal chemistry of apatites, *Acta Cryst.* 2003 ; B59 : 1-16.

- [129] M. Vallet-Regi, J. M. Gonzalez-Calbet, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Solid State Chem.* 2004 ; 32 : 1 - 31.
- [130] S. Cazalbou, D. Eichert, Ch. Drouet, Ch. Combes, Ch. Rey, Minéralisations biologiques à base de phosphate de Calcium, *C. R. Palevol* 2004 ; 3 : 563 - 572.
- [131] D. Bazin, C. Chappard, C. Combes, X. Carpentier, S. Rouzière, G. André, G. Matzen, M. Allix, D. Thiaudière, S. Reguer, P. Jungers, M. Daudon, Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterize Bones, *Osteoporos Int.* 2009 ; 20 : 1065 - 1075.
- [132] D. Bazin, G. André, R. Weil, G. Matzen, E. Véron, X. Carpentier, M. Daudon, Absence of bacterial imprints on struvite-containing kidney stones : a structural investigation at the mesoscopic and atomic scale, *Urology* 2012 ; 79 : 786 - 790.
- [133] L. Cifuentes Delatte, M. Santos, Calcified bacteria in renal stones : electron microscopic Aspects, *Eur Urol.* 1977 ; 3 : 96 - 99.
- [134] R. Castaing, A. Guinier, Sur l'exploration et l'analyse élémentaire d'un échantillon par une sonde électronique. In *Proceedings of the 1<sup>st</sup> international conference on electron microscopy* (pp. 60–63). Delft, 1949.
- [135] R. Castaing, J. Descamps, Sur les bases physiques de l'analyse ponctuelle par spectrographie X. *J Phys (Paris)* 1955 ; 16 : 304 - 310.
- [136] R. Castaing, J. Philibert, C. Crussard, Electron probe microanalysis and its applications to ferrous metallurgy. *J Metals* 1957 ; 9 : 389 - 394.
- [137] R. Castaing, G. Slodzian, Dispositif permettant d'obtenir différentes images ioniques de la surface d'un échantillon, et donnant séparément la distribution superficielle de chaque élément constitutif de l'échantillon à étudier. CNRS patent No. FR1240658. (1959).
- [138] R. Castaing, L. Henry, Filtrage magnétique des vitesses en microscopie électronique *C. R. Acad. Sci. B* 1962 ; 255 : 76 - 78.
- [139] R. Castaing, Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. Thèse de doctorat d'état, Université de Paris, 1952, Publication ONERA N. 55(1951).
- [140] G. Sagnac, Thèse, Faculté des sciences de Paris, seconde Partie : rayons secondaires dérivés des rayons de Röntgen, 1900.
- [141] M. de Broglie, *Compte Rendus de l'académie des sciences*, 1913 ; 157 : 924 - 930.
- [142] M. Quintin, Qui a découvert la fluorescence X, *J. de Physique IV* 1996 ; C4 – 6 : 599 - 610.
- [143] J. Despujols, Spectrométrie d'émission des rayons X. *Fluorescence X*, Editions Weka.
- [144] <http://www.emse.fr/spip/IMG/pdf/fluoresx.pdf>
- [145] H. Friedman, L.S. Birks, *Rev. Sci. Instr.* 1948 ; 19 : 3230.
- [146] P. Philippot, B. Menez, P. Chevallier, Absorption correction procedures for quantitative analysis of fluid inclusions using synchrotron radiation X-ray fluorescence, *Chemical Geology* 1998 ; 144 : 121 - 136
- [147] N. Broll, *Fluorescence X : de la découverte des rayons de Tötgen aux identités de Tertian*, *J. de Physique IV* 1996 ; C4 – 6 : 583 - 597.
- [148] L. Von Hamos, *Ark. Mat. Astron. Phys.* 1945 ; 31 : 1 - 10.
- [149] T. Shiraiwa, N. Fujino, Theoretical calculation of fluorescent X-ray Intensities in fluorescent X-ray spectrochemical analysis. *Jpn. J. Appl. Phys.* 1966 ; 5 : 886 – 899.
- [150] J.X. Wang, D. Piccot, P. Chevallier, F. Legrand, K. Abbas, *Viresyme : logiciel d'exploitation des spectres de Fluorescence X*. Commissariat à l'Energie Atomique -CEA, Rapport 275,1995.
- [151] D. Bonvin, R. Yellepeddi, G. Matula, Analyse des éléments traces dans les matrices légères par fluorescence X : applications et perspectives. *J. Phys.* 2012, IV-12, 77 - 82.
- [152] S. Gomez, R. Rizzo, M. Pozzi-Mucelli, E. Bonucci, F. Vittur, Zinc mapping in bone tissues by histochemistry and synchrotron radiation induced X-Ray emission : correlation with the distribution of alkaline phosphatase *Bone* 1999 ; 25 : 33 - 38.
- [153] R.A. Barrea, C.A. Pérez, A.Y. Ramos, H.J. Sanchez, M. Greno, Distribution and incorporation of zinc in biological calcium phosphates, *X-Ray Spectrom.* 2003 ; 32 : 387 - 395.
- [154] J. Aasetha, G. Boivin, O. Andersend, Osteoporosis and trace elements – An overview, *J. of Trace Elements in Medicine and Biology* 2012 ; 26 :149 - 152.
- [155] A. Hesse, H.J. Dietze, W. Berg, E. Hienzsch, Mass spectrometric trace element analysis of calcium oxalate uroliths, *Eur Urol* 1977 ; 3 : 359 - 365.
- [156] A.A. Levinson, M. Nosal, M. Davidman, E.L.Prien, E.L. Prien, R.G. Stevenson, Trace elements in kidney stones from three areas in the United States». *Invest Urol* 1978 ; 15 : 270 - 280.
- [157] M.A.E. Wandt, M.A.B. Pougnet, Simultaneous determination of major and trace elements in urinary calculi by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma atomic emission spectrometric analysis, *Analyst* 1986 ; 111 : 1249 - 1260.

- [158] J. Joost, R. Tessadri, Trace element investigations in kidney stone patients, *Eur. Urol.* 1987 ; 13 : 264 - 270.
- [159] M.A.B. Pougnet, M. Peisach, A.L. Rodgers, The application of a combined PIXE and XRD approach to the analysis of human stones, *NIM B* 1988 ; 35 : 472 - 477.
- [160] S. Galassini, N.Q. Liu, G. Moschini, A. Tasca, G. Villi, V. Valkovic, Trace element variability in kidney stones, *NIM B* 1989 ; 43 : 556 - 559.
- [161] J. Hofbauer, I. SteVan I, K. Höbarth, G. Vujicic, H. Schwetz, G. Reich, O. Zechner, Trace elements and urinary stone formation: new aspects of the pathological mechanism of urinary stone formation, *J Urol* 1991 ; 145 : 93 - 100.
- [162] I. Durak, Z. Kilic, A. Sahin, M. Akpoyraz, Analysis of calcium, iron, copper and zinc contents of nucleus and crust parts of urinary calculi». *Urol Res* 1992 ; 20 : 23 - 25.
- [163] C.A. Pineda, M. Peisach, Micro-analysis of kidney stones sequentially excreted from a single patient *NIM B* 1994 ; 85 : 896 - 900.
- [164] C.A. Pineda, A.L. Rodgers, V.M. Prozesky, W.J. Przybylowicz, Elemental mapping analysis of recurrent calcium oxalate human kidney stones, *NIM B* 1995 ; 104 : 351 - 355.
- [165] I. Abugassa, S.B. Sarmani, S.B. Samat, Multielement analysis of human hair and kidney stones by instrumental neutron activation analysis with the k0-standardization method ? *Applied Radiation and Isotopes* 1999 ; 50 : 989 - 994.
- [166] H. Perk, T.A. Serel, A. Kosar, N. Deniz, A. Sayin A, Analysis of the trace element contents of inner nucleus and outer crust parts of urinary calculi. *Urol Int* 2002 ; 68 : 286 - 292.
- [167] C.A. Pineda-Vargas, A.L. Rodgers, M.E. Eisa, Nuclear microscopy of human kidney stones, comparison between two population groups, *Rad. Phys. and Chem.* 2004 ; 71 : 947 - 950.
- [168] X. Carpentier, D. Bazin, Ch. Combes, A. Mazouyes, S. Rouzière, P.A. Albouy, E. Foy, M. Daudon, High Zn content of Randall's plaque: A  $\mu$ -X-ray fluorescence investigation, *J. of Trace Elements in Medicine and Biology* 2011 ; 25 : 160 - 165.
- [169] M.L. Giannossi, V. Summa, G. Mongelli, Trace element investigations in urinary stones: A preliminary pilot case in Basilicata (Southern Italy), *J. of Trace Elements in Medicine and Biology* 2013 ; 27 : 91 - 97.
- [170] S.D. Blaschko, J. Miller, Th. Chi, L. Flechner, S. Fakra, A. Kahn, P. Kapahi, M.L. Stoller, Microcomposition of human urinary calculi using advanced imaging techniques, *The Journal of Urology*, 2013 ; 189 : 726 - 734.
- [171] K. Štěpánková, K. Novotný, M. Vašinová Galiová, V. Kanický, J. Kaiser, D.W. Hahn, Laser ablation methods for analysis of urinary calculi: Comparison study based on calibration pellets, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2013 ; 81 : 43-49
- [172] D.J. Sutor, Growth studies of calcium oxalates in the presence of various ions and compounds, *Br. J. Urol.* 1969 ; 41 : 171 - 175.
- [173] J.L. Meyer, WC Thomas Jr, Trace metal-citric acid complexes as inhibitors of calcification and crystal growth. II. Effects of Fe(III), Cr(III) and Al(III) complexes on calcium oxalate crystal growth. *J Urol* 1982 ; 128 : 1376 - 1380.
- [174] T. Oka, T. Yoshioka, T. Koide, M. Takaha, T. Sonoda, Role of Mg in the growth of calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate crystals. *Urol Int* 1987 ; 42 : 89 - 95.
- [175] F. Grases, C. Genestar, A. Mill, The influence of some metallic ions and their complexes on the kinetics of crystal growth of calcium oxalate». *J. Crystal Growth* 1989 ; 94 : 507 - 515.
- [176] A. Bigi, E. Foresti, M. Gandolfi, M. Gazzano, N. Roveri, Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization, *J Inorg Biochem* 1995 ; 58 : 49 - 58.
- [177] H.E. Lundager Madsen, Influence of foreign metal ions on crystal growth and morphology of brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and its transformation to octacalcium phosphate and apatite. *J Cryst Growth* 2008 ; 50 : 2602 - 2612.
- [178] A. Tang, H.F. Chappell, M.T. Dove, R.J. Reeder, Y.J. Lee, Zinc incorporation into Hydroxylapatite, *Biomaterials* 2009 ; 30 : 2864 - 2872
- [179] L.A. Touryan, M.J. Lochhead, B.J. Marquardt, V. Vogel, Sequential switch of biomineral crystal morphology using trivalent ions, *Nature Materials* 2004 ; 3 : 239 - 243.
- [180] D. Bazin, M. Daudon, *Nouvelles Méthodes d'étude des calculs et plaques de Randall*, *Actualités Néphrologiques Jean Hamburger*, Ed. Flammarion – Médecine (2012).
- [181] E. Rokita, C. Hermes, H.F. Nolting, et al. ; Substitution of Ca by Sr within selected Ca phosphates, *J. Crystal Growth* 1993 ; 130 : 543-552.
- [182] G. Komaromy-Hiller, K.O. Ash, R. Costa, K. Howerton, Comparison of representative ranges based on U.S. patient population and literature reference intervals for urinary trace elements, *Clin Chim Acta* 2000 ; 296 : 71-90.

- [183] S. Caroli, A. Alimonti, E. Coni, F. Petrucci, O. Senofonte, N. Violante, Occupational exposure of goldsmith workers of the area of Rome to potentially toxic metals as monitored through hair analysis, *Crit Rev Anal Chem* 1994 ; 24 : 363-398.
- [184] G. Huel, N. Frery, L. Takser et al. Evolution of blood lead levels in urban French population (1979–1995), *Rev Epidemiol Sante Publique* 2002 ; 50 : 287-297.
- [185] C. Reiners, H. Hänscheid, M. Lassmann, M. Tiemann, M. Kreissl, J. Rendl, D. Bier, X-ray fluorescence analysis (XFA) of thyroidal iodine content (TIC) with an improved measuring system, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998 ; 106 : S31 – S33.
- [186] M. Shimura, A. Saito, S. Matsuyama, T. Sakuma, Y. Terui, K. Ueno, H. Yumoto, K. Yamauchi, K. Yamamura, H. Mimura, Y. Sano, M. Yabashi, K. Tamasaku, K. Nishio, Y. Nishino, K. Endo, K. Hatake, Y. Mori, Y. Ishizaka, T. Ishikawa, Element Array by Scanning X-ray Fluorescence Microscopy after Cis-idaminedichloro-Platinum(II) Treatment, *Cancer Res* 2005; 65: 4998 - 5002.
- [187] J.C. Heughebaert, Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques ; Thèse d'état Institut National Polytechnique de Toulouse: Sciences Physiques, France (1977).
- [188] H. Fleisch, Inhibitors of calcium phosphate precipitation and their role in biological mineralization, *J. of Crystal Growth* 1981 ; 53 : 120 - 134.
- [189] D.J. Greefield, J.D. Termine, E.D. Eanes, A chemical study of apatites prepared by hydrolysis of amorphous Ca phosphate in carbonate-containing aqueous solution ; *Calcif. Tis. Res.* 1974 ; 14 : 131-138.
- [190] J.W.L. Wilson, P.G. Werness, L.H. Smith, Inhibitors of crystal growth of hydroxyapatite : a constant composition approach ; *J. Urol.* 1985 ; 134 : 1255-1258.
- [191] V.M. Goldschmidt. In *Geochemistry*, Oxford University Press, London, 1954.
- [192] P. Jungers, M. Daudon, A. Leduc, *Lithiase urinaire*, Ed. Medecine-Sciences, Flammarion 1989.
- [193] M. Daudon, Cinq calculs – cinq photos – cinq diagnostics – cinq astuces, *Prog. Urol. – FMC* 2012 ; 22 : F87 – F93.
- [194] <http://www-llb.cea.fr/>
- [195] H.M. Rietveld, A profile refinement method for nuclear and magnetic structure *J. Appl. Cryst.* 1969 ; 2 : 65 -71.
- [196] R.J. Hill, C.J. Howard, Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld method, *J. Appl. Cryst.* 1987 ; 20 : 467 – 476.
- [197] D.L. Bish, S.A. Howard, Quantitative phase analysis using the Rietveld method, *J. App. Cryst.* 1988 ; 21 : 86 – 91.
- [198] R.J. Hill, Expanded use of Rietveld method in studies of phase abundance in multiphase Mixtures Powder Diffraction 1991 ; 6 : 74 – 77.
- [199] J. Rodriguez-Carvajal, "Recent Advances in Magnetic Structure Determination by Neutron Powder Diffraction", *Physica B* 192, 55-69 (1993)
- [200] J. Rodriguez-Carvajal, "FULLPROF: A Program for Rietveld Refinement and Pattern Matching Analysis", Abstracts of the Satellite Meeting on Powder Diffraction of the XV Congress of the IUCr, p. 127, Toulouse, France (1990).
- [201] [http://www-llb.cea.fr/fullweb/fp2k/fp2k\\_intro\\_ref.htm](http://www-llb.cea.fr/fullweb/fp2k/fp2k_intro_ref.htm)
- [202] Powder diffraction file (PDF), International centre for diffraction data, 12 campus Blvd, Newton square, PA 19073-3273, USA, <http://www.idd.com>.
- [203] D. Bazin, M. Daudon, G. André, R. Weil, E. Véron, G. Matzen, Therapy modifies cystine kidney stones at the macroscopic scale. Does such alterations exist at the mesoscopic and nanometer scale ? En cours de soumission
- [204] <http://www-llb.cea.fr/spectros/pdf/g41-llb.pdf>
- [205] E. Letavernier, O. Traxer, J.-P. Haymann, D. Bazin, M. Daudon, Cystinurie, *Progrès en Urologie – FMC* 2012 ; 22 : F119 - F123.
- [206] B. Hannache, D. Bazin, A. Boutefnouchet, M. Daudon, Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro : étude à l'échelle mésoscopique, *Progrès en urologie* 2012 ; 22 : 577 - 582.
- [207] E.A. Abdel-Aal, S. Daosukho, H. El-Shall, Effect of supersaturation ratio and Khella extract on nucleation and morphology of kidney stones, *J. of Crystal Growth* 2009 ; 311 : 2673 – 2681
- [208] Y.M. Fazil Marickar, N. Sylaja, P. Koshy, Role of scanning electron microscopy in identifying drugs used in medical Practice, *Urol Res* 2009 ; 37 : 299 - 303.

### Chapitre III : Épidémiologie

Une multitude d'études épidémiologiques ont été publiées et l'analyse de cette littérature classée par ordre chronologique [1-101] permet de discerner différents types d'investigations suivant les critères retenus. Les investigations menées en fonction de la géographie concernent soit des continents, l'Europe [92], l'Afrique [10], soit différents pays l'Allemagne [11,13,69], l'Angleterre [64], l'Arabie Saoudite [42], l'Arménie [65], les États Unis [39,70,94], la France [48,77,78], l'Iran [20,96], le Japon [32,57], la Jordanie [27], le Pakistan [21], le Soudan [50], Taiwan [68] la Tunisie [73], ou encore des régions spécifiques de certains pays [6,7,14,22,24,29,31,35,37,43,44,46,47,51,55,59,62,66,71,72,74,80,81,83, 100]. D'autres facteurs modulant les caractéristiques physicochimiques de la lithiase sont abordés comme la classe d'âge [25,28, 75] ou encore le sexe [40, 75, 82]. Ainsi de nombreuses études s'intéressent plus particulièrement à la lithiase de l'enfant [3,8,19,36,42,53,55,67,78,93,95, 99]. Chez l'adulte, comme chez l'enfant, la plupart des études épidémiologiques mettent en évidence des différences significatives en fonction du sexe puisque l'homme et la femme s'avèrent très différents sur ce point [15, 32, 82]. Les hommes sont en effet environ deux fois plus touchés que les femmes (9% contre 4 %) et, chez l'enfant, un rapport garçon/fille élevé est généralement observé durant les premières années de vie, le ratio tendant à se réduire ensuite [3, 46, 58, 78]. Enfin, ces études peuvent aussi établir des liens entre la lithiase et les habitudes nutritionnelles [2, 9, 49] ou encore les conditions socioéconomiques [15].

Quelques points clés se dégagent de l'ensemble de ces études. Ainsi, celles dont le sujet de recherche est la lithiase chez l'enfant soulignent l'importance des maladies héréditaires, des infections urinaires ou encore des carences nutritionnelles. Les formes héréditaires sont pour la plupart sévères, fréquemment associées à une néphrocalcinose et exposent au risque d'évolution vers l'insuffisance rénale en l'absence d'un traitement étiologique approprié et précocement institué. Chez les jeunes adultes, ces études soulignent l'importance prise par les calculs sur lesquels est présent un dépôt blanc dénommé plaque de Randall durant ces trois dernières décennies. Cette plaque de Randall sert en effet de centre nucléateur du calcul et est responsable d'une grande partie des coliques néphrétiques observées chez les jeunes [102]. Elle est fort probablement liée à une modification des habitudes alimentaires chez les enfants et pose des questions sur la prise de vitamine D [103]. Chez les adultes, les lithiases rénales héréditaires sont moins importantes (2 % des calculs chez l'adulte contre 10 % chez l'enfant) et les habitudes alimentaires deviennent

prépondérantes. Le manque d'exercice physique associé à une alimentation riche en sucres (glucose mais surtout de nos jours fructose) et en protéines expliquent un lien étroit entre la lithiase et l'un des problèmes de santé publique majeurs de notre société : le diabète de type 2. Ce lien s'exprime dans une séquence syndrome métabolique, diabète de type 2 et lithiase urique. L'impact sociétal est considérable dans la mesure où chez la moitié des transplantés rénaux dans les pays industrialisés, le diabète de type 2 est impliqué. On retrouve ainsi le fait que la lithiase fasse partie des grandes pathologies comme l'hypertension artérielle ou les maladies cardiovasculaires dans lesquelles les facteurs d'environnement ont un rôle majeur. De nos jours, il est à noter également un retour des lithiases d'origine infectieuse probablement lié à la baisse du niveau socioéconomique de la population qui engendre un accès au soin insuffisant.

Dans ce chapitre, nous étudierons les caractéristiques épidémiologiques tirées des calculs, sachant que leur portée est limitée par le nombre limité de calculs disponibles pour cette étude.

### **III.1 Classification morphoconstitutionnelle**

Après avoir analysé les 82 calculs par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier, nous avons pu les classer dans 7 catégories dont 5 définies par le composant lithiasique majoritaire (whewellite, weddellite, phosphates de calcium, acide urique et cystine), une 6<sup>ème</sup> catégorie regroupant les calculs d'infection à germes uréasiques (PAM) et une 7<sup>ème</sup> pour les calculs de structure mixte associant en proportions équivalentes oxalate de calcium et phosphate de calcium. Cette analyse statistique permet d'esquisser l'épidémiologie associée à la lithiase urinaire de l'Est Algérien encore non faite jusqu'à ce jour bien qu'une étude épidémiologique soit en cours sur un ensemble plus important de calculs (>400).

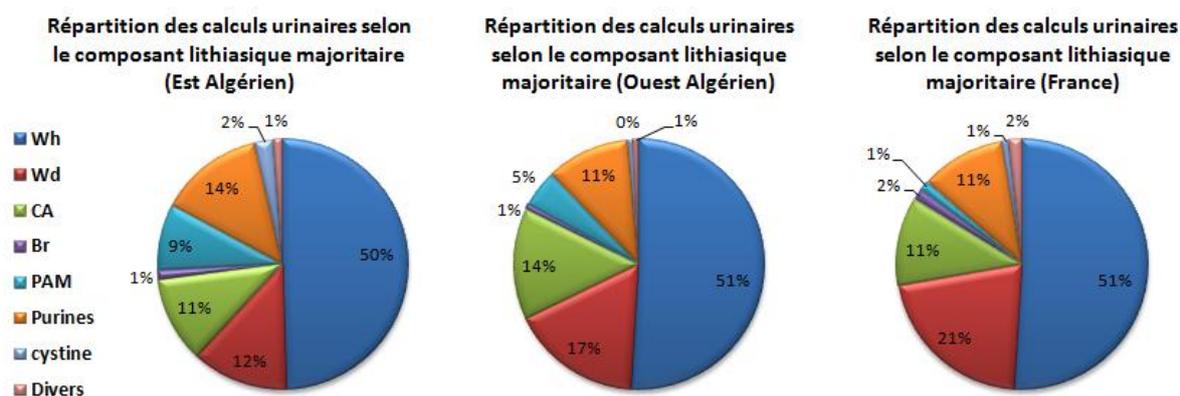
### **III.2 Répartition des composants lithiasiques**

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une prédominance des calculs oxalocalciques (53%) suivis par l'acide urique (15%) et les calculs d'infection (la struvite est majoritaire dans 8% des calculs), alors que les phosphates de calcium ne représentent que 5% des cas ; en dernier lieu vient la cystine avec 2%. Les calculs mixtes (OxCa + PhCa) ne représentent que 9% des calculs analysés (tableau 1). Parmi les calculs oxalocalciques, on distingue ainsi la prédominance de la whewellite qui est 4 fois plus fréquente que la weddellite. Le tableau 1 et la figure 1 montrent cette répartition des composants lithiasiques pour l'ensemble de la série

de calculs analysés par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. Selon cette étude la maladie lithiasique touche plus les hommes que les femmes avec un rapport H/F = 1,79.

**Tableau 1:** Répartition des calculs urinaires selon le composant lithiasique majoritaire

Composant lithiasique	Total Est Algérien Nombre de calculs (%)	Total Ouest Algérien (%)	Total France (%)
Calcique	60 (74%)		
Calcium oxalate	50 (61,7%)	67%	71,8%
Whewellite	40 (49,4%)	50,3%	50,7%
Weddellite	10 (12,3%)	16,7%	21,1%
Phosphate de calcium	10 (12,3%)	16,7%	13,6%
Carbapatite	9 (11,1%)	14,1%	11,4 %
Brushite	1 (1,2%)	0,8%	1,5 %
Autre phosphate	0 (0%)	1,8%	0,7%
Non calcique	21 (25,9%)		
Struvite	7 (8,6%)	4,8%	1,3%
Acide Urique	11 (13,5%)	10,6%	10,8%
Cystine	2 (2,4%)	0,7%	0,9%
Divers	1 (1,2%)	0,7%	1,7%



**Figure 1:** la répartition des calculs urinaires selon le composant lithiasique majoritaire, **Wh** : whewellite ; **Wd** : weddellite ; **CA** : carbapatite ; **Br** : brushite ; **PAM** : phosphate ammoniaco-magnésien ; **Purines** : acides uriques et urates.

En comparaison avec des études réalisées en France [83] la distribution des calculs en fonction du composant majoritaire présente quelques différences par rapport au profil épidémiologique excepté la whewellite qui reste le constituant lithiasique prépondérant avec une fréquence comparable (50,7% en France contre 50,3 % pour l'Ouest Algérien et 49,4% pour l'Est Algérien). Notre série de calculs semble présenter :

- plus d'acide urique : 13,5% contre 10,6% pour l'Ouest Algérien et 10,8% en France, mais en raison du faible effectif de notre série, la différence n'est statistiquement pas significative ;
- moins de weddellite : 12,3% contre 16,7% pour l'Ouest Algérien et 21,1% en France (p=0,06 vs France) ;
- plus de struvite : 8,6% versus 4,8% pour l'Ouest Algérien et 1,3% en France (p<0,0001 par rapport à la France).

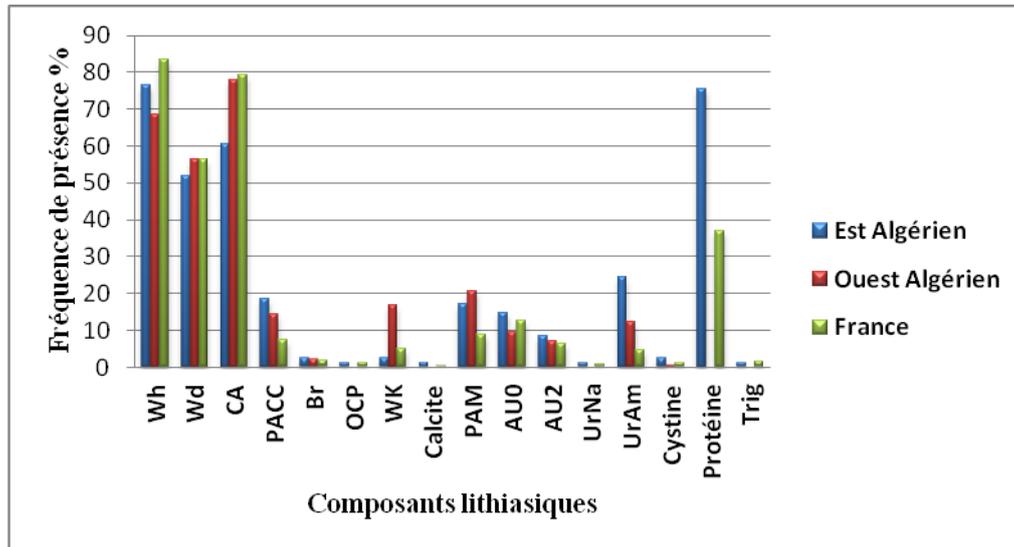
Au total, la distribution des calculs de l'Est Algérien n'apparaît pas significativement différente de celle qui a été rapportée dans l'Ouest Algérien. Cependant, une analyse plus fine des résultats (tableau 2) fait apparaître quelques particularités, notamment une fréquence élevée de l'urate d'ammonium, détecté dans près d'un quart des calculs de notre cohorte contre 12,2% dans l'Ouest Algérien (p<0,01) et à peine 5% en France (p < 0,0001). Par ailleurs, on observe dans notre série une moindre proportion de calculs contenant de la carbapate ou de la whitlockite, soit globalement moins de calculs contenant des phosphates calciques (p < 0,001 vs Ouest Algérien).

**Tableau 2.** La fréquence des composés lithiasiques

Composant lithiasique	Total (%)	Ouest Algérien [47]	France [40]
Oxalate de calcium	68(83,9%)	80,0	86,5%
Whewellite	62 (76,5%)	68,6%	83,4%
Weddellite	42 (51,8%)	56,4%	56,3 %
Phosphate de calcium	51 (63%) **	85,3	79,8%
CA	49 (60,5%) ** <sup>x</sup>	77,8%	79,4 %
PACC	15 (18,5%)	14,2%	7,3%
Brushite	2 (2,4%)	2,2%	1,7%
OCP	1 (1,2%)	-	1,1%
Whitlockite	2 (2,4%) **	16,7%	5,1%
calcite	1 (1,2%)	-	0,3%
Struvite	14 (17,2%)	20,6%	8,9%
Acide urique anhydre	12 (14,8%)	9,4%	12,5%
Acide urique dihydraté	7 (8,6%)	6,9%	6,4%
Urate de sodium	1 (1,2%)	-	0,7%
Urate d'ammonium	20 (24,6%) ** <sup>xx</sup>	12,2%	4,8%
Cystine	2 (2,4%)	0,5%	1,2%
protéines	61 (75,3%)	-	36,8%
triglycérides	1 (1,2%)	-	1,4%

\* p < 0,01 ; \*\* p < 0,001 vs Ouest Algérien

<sup>x</sup> p < 0,001 ; <sup>xx</sup> p < 0,00001 vs France



**Figure 2.** Fréquence des composants lithiasiques pour des calculs urinaires provenant de l'Est Algérien et de la France, **Wh** : whewellite ; **Wd** : weddellite ; **CA** : carbapatite ; **PACC** : phosphates amorphes de calcium carbonaté ; **Br** : brushite ; **OCP** : phosphate octocalcique ; **WK** : whitlockite ; **PAM** : phosphate ammoniaco-magnésien ; **AU0** : acide urique anhydre ; **AU2** : acide urique dihydraté ; **UrNa** : urate de sodium ; **UrAm** : urate d'ammonium ; **Trig** : triglycérides.

Les différences principales entre l'Est Algérien et la France sont marquées pour les composés suivants : CA, whitlockite, urate d'ammonium et protéines, toutes phases chimiques qui pourraient coïncider avec une plus grande fréquence des lithiases d'infection dans l'Est Algérien. Les valeurs associées aux autres phases sont similaires à celles mesurées pour la France. Cependant, si l'on examine plus attentivement les phases cristallines, on note que la struvite, marqueur universellement reconnu des infections urinaires à germes uréasiques, n'est pas plus fréquente dans notre série que dans celle de l'Ouest Algérien. De plus, la whitlockite qui, elle aussi, est souvent considérée comme un marqueur des processus infectieux urinaires, est significativement moins fréquente dans l'Est Algérien par comparaison avec les données obtenues dans l'ouest du pays. Ces arguments suggèrent que les infections urinaires ne sont pas plus fréquentes, et peut-être même moins fréquentes dans notre région que dans la région ouest. Un autre argument peut être tiré de l'article portant sur les 1354 calculs de l'Ouest Algérien publié en complément du premier travail portant sur 360 calculs. Dans le second article, seule la fréquence de la struvite a été considérée, indépendamment de la proportion des calculs où elle était majoritaire. Les données publiées rapportent que 390 calculs, soit 28,8%, contenaient de la struvite, soit une augmentation de 8 points par rapport à la première série. En examinant la répartition des calculs selon le sexe, on note que 37,8% des calculs d'origine féminine contenaient de la struvite et 24,5% des calculs

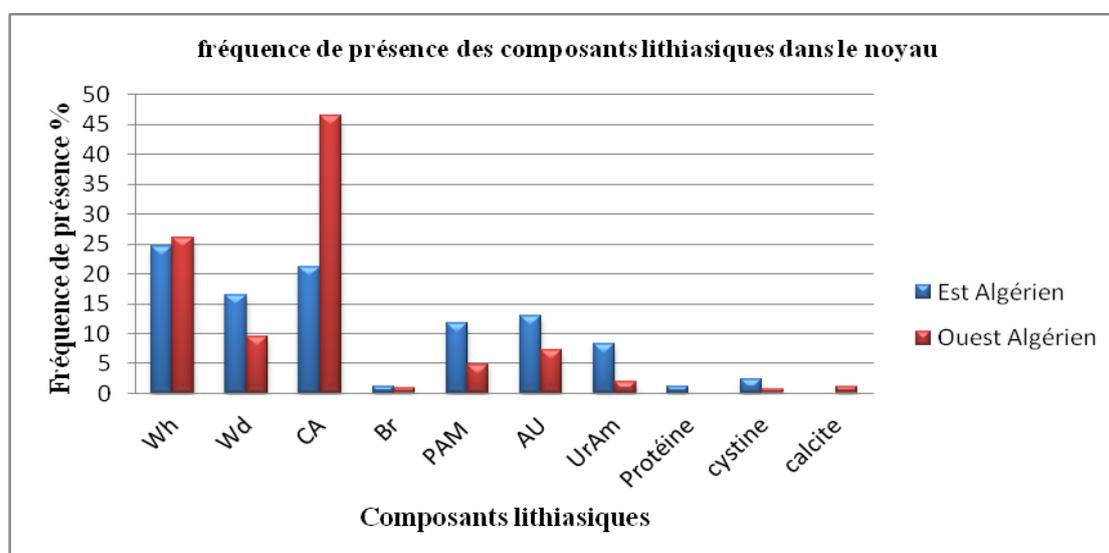
chez l'homme. Ces chiffres sont beaucoup plus élevés que ceux observés dans notre série, suggérant fortement que l'infection est moins impliquée dans les calculs de l'Est Algérien que dans ceux recueillis à l'Ouest du pays.

Finalement, si l'on considère les composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie (Tableau 3 et figure 3), on remarque la diminution très nette de la fréquence de l'apatite au profit des espèces chimiques marqueurs d'infection (struvite, UrAm). L'acide urique est aussi plus abondant ( 12.9% pour l'Est Algérien contre 7.3% pour l'Ouest Algérien,  $p=0,05$ ).

**Tableau 3.** La fréquence des composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie.

Composant lithiasique	Est Algérien	Ouest Algérien [81]
Whewellite	24,7	26.1%
Weddellite	16,5	9.5%
CA	21,2 ***	46.5%
Brushite	1,2	0.8%
Struvite (PAM)	11,7 *	4.7%
AU	12,9*	7.3%
UrAm	8,2 **	2%
Protéine	1,2	0%
Cystine	2,4	0.7%
Calcite	0	1,1%
Divers	0	1.4%
Total	100	100 %

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Ouest Algérien



**Figure 3.** Fréquence des composants lithiasiques dans le noyau pour des calculs urinaires provenant de l'Est et de l'Ouest Algérien.

Si l'on prend en considération simultanément la fréquence des constituants et leur présence comme agent nucléateur, il ressort que les calculs de l'Est Algérien contiennent moins souvent des phosphates et plus souvent des purines que les calculs de l'Ouest Algérien, ce qui oriente vers d'autres facteurs étiologiques que l'infection urinaire, en particulier des déséquilibres nutritionnels et des troubles digestifs. De ce point de vue, il est remarquable que plus de la moitié des calculs de notre série contenant de l'urate d'ammonium contiennent par ailleurs de l'oxalate de calcium ou de l'acide urique, mais pas de phosphates calciques ni de struvite.

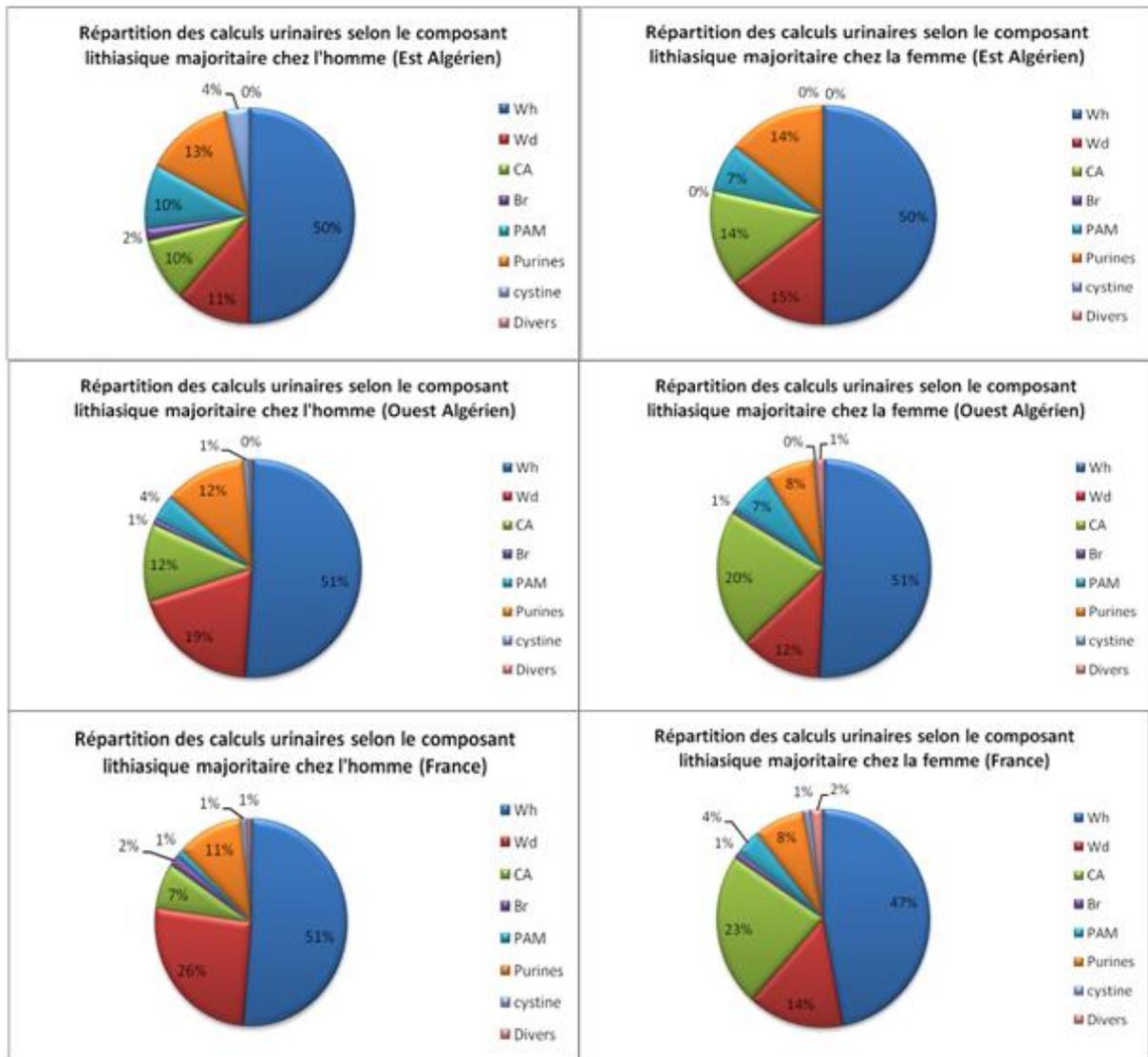
### III.3 Influence du sexe

Chez l'homme, le nombre total de calculs étudié est de 52. L'examen des données (Tableau 4 et figure 4) révèle une réduction de la proportion de calculs d'oxalate de calcium dans notre série (61.5% contre 69.3% pour l'Ouest Algérien et 75.7% pour la France). La différence porte exclusivement sur la weddellite dont la fréquence est significativement plus faible dans l'Est Algérien par rapport à la France ( $p < 0,05$ ). Il n'y a pas de différences significatives entre les deux régions de l'Algérie. Cette diminution n'est observée que chez l'homme, pas chez la femme. Les calculs de weddellite étant essentiellement calcium-dépendants, cela suggère que les hommes lithiasiques de l'Est Algérien sont moins exposés que les Français à l'hypercalciurie, peut-être en relation avec une moindre consommation de produits laitiers, ce qui reste à vérifier par des études nutritionnelles et biochimiques.

**Tableau 4:** Répartition des calculs selon le composant lithiasique majoritaire par sexe

Composant lithiasique	Est Algérien		Ouest Algérien		France	
	H Nombre(%)	F Nombre(%)	H	F	H [77]	F [77]
Calcique						
Oxalate de calcium	32 (61,5%)*	18 (64,3%)	69.3%	61.9%	75.7%	59.8%
Whewellite	26 (50%)	14 (50%)	50.5 %	49.8%	50.4%	45.6%
Weddellite	6 (11,5%) *	4 (14,3%)	18.8 %	12.1%	25.3%	14.2%
Phosphate de calcium	6 (11,5%)	4 (14,3%)	13.4%	22.5%	9.1%	24%
Carbapatite	5 (9,6%)	4 (14,3%)	11.4%	20%	7%	22.1%
Brushite	1 (1,9%)	0	0.9%	0.6%	1.7%	1%
Non calcique						
Struvite	5 (9,6%)	2 (7,1%)	3.9%	6.7%	1.2%	3.7%
Purines	7 (13,5%)	4 (14,3%)	12.1%	7.3%	10.8%	7.5%
Cystine	2 (3,8%)	0	0.9%	0.3%	1%	1%
Divers	0	0	0.4%	1.3%	0.7%	1.9%

\*  $p < 0,05$  vs France



**Figure 4.** Répartition des calculs urinaires selon le constituant lithiasique majoritaire chez l'homme et chez la femme (Régions : Est d'algérie, Ouest d'algérie et la France)

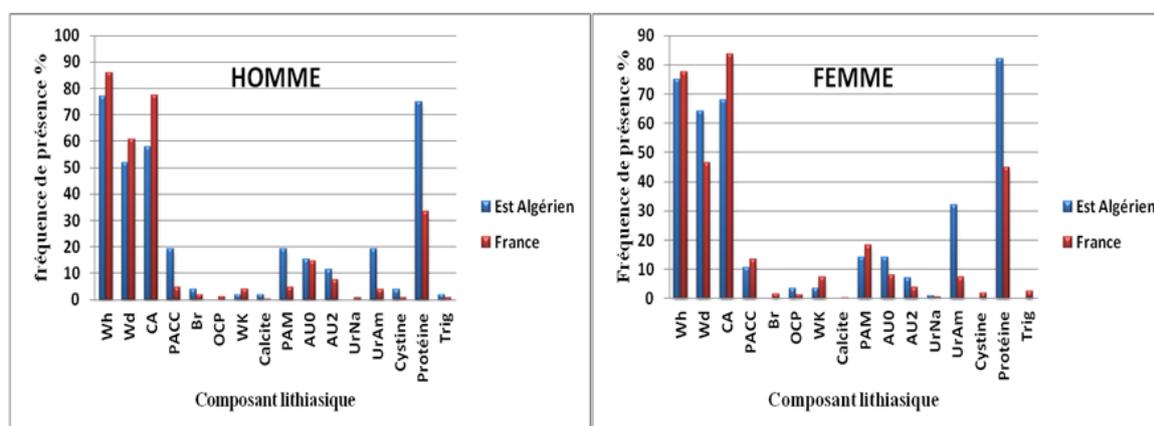
M. Daudon et *al.* ont montré dans une étude publiée en 2011 [91] que l'oxalate de calcium, en particulier dihydraté (weddellite), et l'acide urique étaient plus fréquents chez l'homme que chez la femme (23,4% versus 14%,  $p < 0,00001$  respectivement pour la weddellite et 9,5% versus 6,4%,  $p < 0,001$  respectivement pour l'acide urique) tandis que les phosphates calciques étaient plus fréquents chez la femme (25,2% versus 7,6% chez l'homme,  $p < 0,00001$ ). Notre étude ne confirme pas ces données dans notre pays où les différences entre hommes et femmes concernant la répartition des oxalates de calcium, des phosphates de calcium et des purines ne sont pas significatives (Tableau 4).

En ce qui concerne la fréquence des composés lithiasiques par sexe (Tableau 5 et figure 5), chez l'homme les phases chimiques signant l'infection (struvite, PACC, urate d'ammonium) sont plus fréquentes qu'en France. Chez la femme c'est surtout l'urate d'ammonium qui est associé à cette tendance. A noter que la fréquence des protéines est également bien plus élevée dans l'Est Algérien qu'en France, aussi bien chez l'homme (75% vs 33,3%,  $p < 0,000001$ ) que chez la femme (82.1% vs 44.7%,  $p < 0,0001$ ).

**Tableau 5.** La fréquence des composés lithiasiques par sexe

Composant lithiasique	H Est Algérien (%)	F Est Algérien (%)	H France (%)	F France (%)
Oxalate de calcium	45 (86,5%)	23 (82,1%)	89%	80.8%
Whewellite	40 (76,9%)	21 (75%)	85.9%	77.7%
Weddellite	27 ( 51,9%)	18 (64,2%)	60.7%	46.5%
Phosphate de calcium	30 (57,7%) *	19 (67,8%) *	77.9%	84.0%
CA	30 (57,7%) *	19 (67,8%) *	77.5%	83.6%
PACC	10 (19,2%) **	3 (10,7%)	4.6%	13.4%
Brushite	2 (3,8%)	0	1.7%	1.6%
OCP	0	1 (3,5%)	1%	1.2%
Whitlockite	1 (1,9%)	1 (3,5%)	4.1%	7.5%
calcite	1 (1,9%)	0	0.2%	0.3%
Struvite (PAM)	10 (19,2%) **	4 (14,2%)	4.8%	18.2%
Acide urique anhydre	8 (15,3%)	4 (14,2%)	14.5%	7.9%
Acide urique dihydraté	6 (11,5%)	2 (7,1%)	7.5%	3.9%
Urate de sodium	0	1	0.9%	0.5%
Urate d'ammonium	10 (19,2%) ***	9 (32,1%) **	3.8%	7.2%
Cystine	2 (3,8%)	0	0.9%	2%
Protéines	39 (75%) ***	23 (82,1%) **	33.3%	44.7%
Triglycérides	1 (1,9%)	0	0.8%	2.5%

\*  $p < 0,01$  ; \*\*  $p < 0,0001$  ; \*\*\*  $p < 0,000001$  vs France



**Figure 5.** Fréquence des composants lithiasiques par sexe pour des calculs urinaires provenant de l'Est Algérien et de la France.

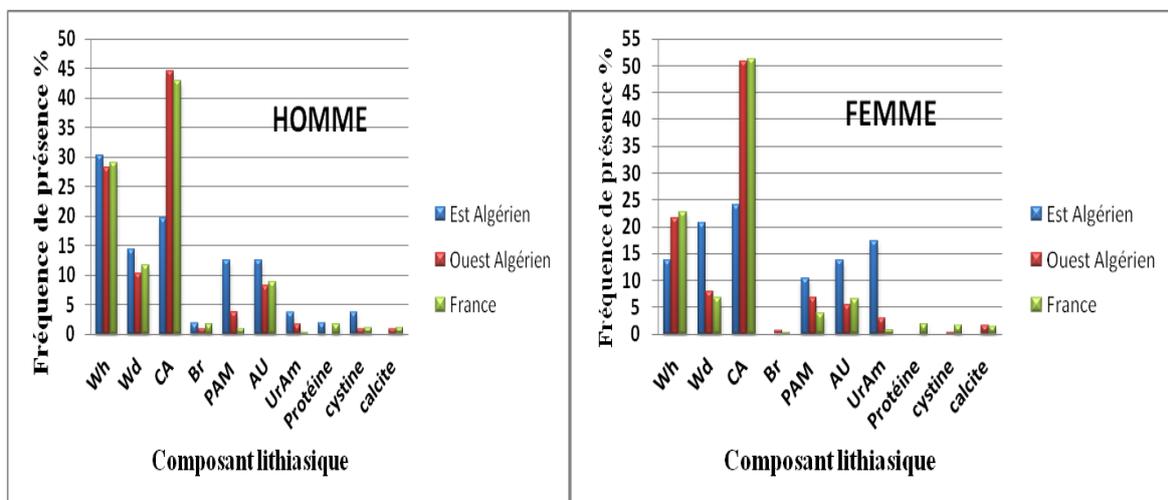
L'une des données remarquables concernant la nucléation des calculs de l'Est Algérien est la faible proportion de calculs nucléés sur carapatite aussi bien chez l'homme que chez la femme comparativement à la France, mais aussi par rapport à l'Ouest Algérien. En contrepartie, on note une augmentation très significative dans les deux sexes et notamment chez la femme, de la proportion de calculs nucléés sur l'urate d'ammonium, alors que la proportion des calculs nucléés sur la struvite n'est pas significativement différente (Tableau 6 et figure 6). Ces observations orientent à nouveau vers des lithiases associées à des déséquilibres nutritionnels accompagnés de dysfonctionnements de l'appareil digestif, voire des anomalies de la glycorégulation.

**Tableau 6.** La fréquence des composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie.

Composant lithiasique	H Est Algérien (%)	F Est Algérien (%)	H Ouest Algérien (%)	F Ouest Algérien (%)	H France (%)	F France (%)
Whewellite	30,3	13,8 <sup>x</sup>	28.1%	21.6%	29%	22.6%
Weddellite	14,3	20,7 <sup>*,xx</sup>	10.3%	7.9%	11.6%	6.7%
CA	19,6 <sup>***,xxx</sup>	24,1 <sup>**,xx</sup>	44.6%	50.8%	42.8%	51.3%
Brushite	1,8	0	0.9%	0.6%	1.7%	0.3%
Struvite (PAM)	12,5 <sup>xxxx</sup>	10,3	3.8%	6.7%	0.9%	3.8%
AU	12,5	13,8	8.2%	5.4%	8.8%	6.5%
UrAm	3,6 <sup>xxx</sup>	17,3 <sup>***,xxxx</sup>	1.6%	2.9%	0.3%	0.8%
Protéine	1,8	0	/	/	1.7%	1.9%
Cystine	3,6	0	0.9%	0.3%	1%	1.6%
Calcite	0	0	0.9%	1.6%	1%	1.4%

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001 vs Ouest Algérien

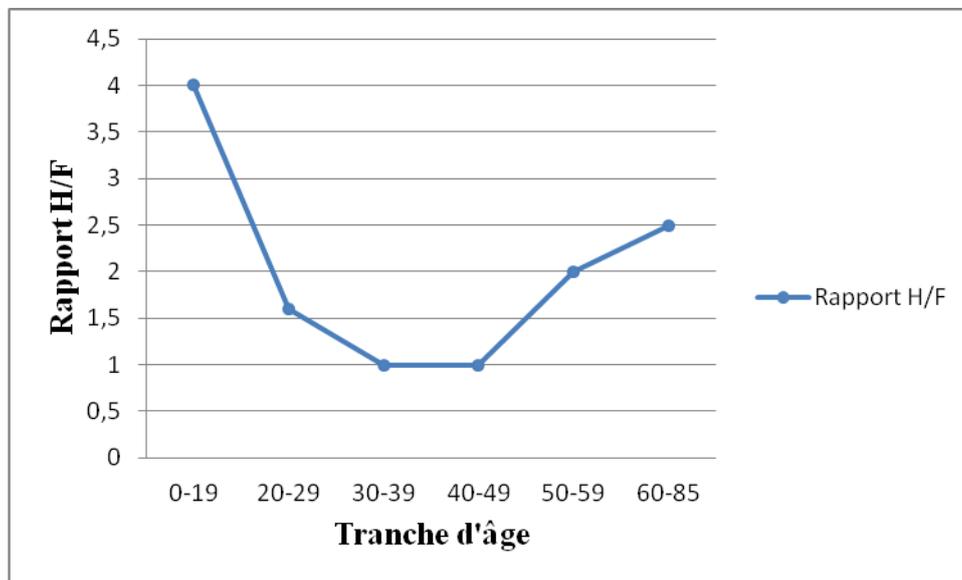
<sup>x</sup> p < 0,05 ; <sup>xx</sup> p < 0,01 ; <sup>xxx</sup> p < 0,001 ; <sup>xxxx</sup> p < 0,00001 vs France



**Figure 6.** Fréquence de présence des composants lithiasiques dans le noyau par sexe (Régions : Est d'algérie, Ouest d'algérie et la France)

### III.4 Influence de l'âge

Les effectifs étant trop faibles, il n'est pas pertinent de discuter l'influence de l'âge sur la composition des calculs. Par contre la figure 7 qui donne l'évolution du rapport H/F en fonction de l'âge montre que le sujet masculin est plus exposé à la lithiase aux extrémités de la vie.



**Figure 7.** Rapport H/F pour l'Est Algérien

Une explication possible est donnée par le fait qu'au début de son existence, le garçon est plus sensible aux processus d'infection que la fille. Aux âges plus élevés, la lithiase urique augmente chez l'homme avec l'âge en rapport avec une prévalence accrue de syndrome métabolique ou de diabète de type 2 et parallèlement une prévalence élevée de rétention urinaire associée à l'hypertrophie prostatique.

### III.5 La localisation des calculs

La plupart des calculs de notre série étaient localisés dans le haut appareil urinaire (rein ou uretère) et seulement 15,8% se trouvaient dans la vessie, tous chez des sujets de sexe masculin. La localisation des calculs de l'étude réalisée dans l'Ouest Algérien montrait que 22,6% étaient aussi de localisation vésicale. La différence n'est pas statistiquement significative. En revanche, la lithiase vésicale est beaucoup moins fréquente dans les pays industrialisés. En France [104], elle ne représente que 4,95% des calculs de l'appareil urinaire ( $p < 0,0001$  versus Est Algérien).

### **III.6 Conclusion préliminaire**

Même si le nombre de calculs pris en compte dans cette étude épidémiologique est faible, des tendances se dessinent. En effet, les caractéristiques physicochimiques des lithiases dévoilent des similarités entre la lithiase urinaire de l'est Algérien et celle associée aux pays industrialisés. Avec l'élévation du niveau de vie, les caractéristiques physicochimiques des calculs évoluent, les phosphates de calcium ne constituent plus la phase majoritaire et l'oxalate de calcium le devient. Si les processus d'infection chroniques régressent, leurs contributions à la lithiase restent significatives.

## Références

- [1] T. Inada, Research on urolithiasis. *Japan J. Urol.* 1966 ; 57 : 917 - 929.
- [2] D.A. Andersen, Historical and geographical differences in the pattern of incidence of urinary stones considered in relation to possible aetiological factors. In: Hodgkinson A, Nordin BEC (eds.), *Renal stone research symposium*, London, Churchill, 1969 pp 7-31.
- [3] J. Nahlovsky, M. Farhat, S. Gharbi, Fréquence extraordinaire de la lithiase chez les enfants en Tunisie et leurs causes probables. *J. Urol. Néphrol.* 1969 ; 75 : 539 - 541.
- [4] A. Norlin, B. Lindell, P.O. Granberg, N. Lindvall, Urolithiasis. A study of its frequency. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1976 ; 10 : 150 - 153.
- [5] A. Hesse, H.J. Schneider, S. Schroder, R. Wegner, Ergebnisse der AIV-gerechten Auswertung von 10000 Harnsteinanalysenbelegen. *Zschr Uro Bd* 1976 ; 69 : 1 - 9.
- [6] D.J. Barker, S.P. Donnan, Regional variations in the incidence of upper urinary tract stones in England and Wales. *B.M.J.* 1978 ; 1 : 67 - 70.
- [7] C.M. Johnson, D.M. Wilson, W.M. O'Fallon, R.S. Malek, L.T. Kurland, Renal stone epidemiology : a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kid. Int.* 1979 ; 16 : 624 - 631.
- [8] D. Remzi, Urolithiasis in Infancy *Urology* 1980 ; 15 : 248 - 250.
- [9] W.G. Robertson, M. Peacock, P.J. Heyburn, F.A. Hanes, Epidemiological risk factors in calcium stone disease. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1980 ; 53 : 15 - 30.
- [10] R.G. Hendrickse, Epidemiology and prevention of kidney disease in Africa *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1980 ; 74 : 8 - 16.
- [11] W. Tschöpe, E. Ritz, M. Haslbeck, H. Mehnert, H. Wesch, Prevalence and incidence of renal stone disease in a German population sample. *Klin Wochenschr* 1981 ; 59 : 411 - 412.
- [12] H.J. Schneider, C. Berg, Epidemiologische aussagen zum harsteinleiden auf der grundlage von 100 000 Harnteinanalysen. Unter besonderer berucksichtigung der rezidive. *Fortschr Urol Nephrol* 1981 ; 17 : 34 - 39.
- [13] E.W. Vahlensieck, D. Bach, A. Hesse, Incidence, Prevalence and mortality of urolithiasis in the German Federal Republic. *Urol Res* 1982 ; 10 : 161 - 164.
- [14] W.G. Robertson, M. Peacock, The pattern of urinary stone disease in Leeds and in the United Kingdom in relation to animal protein intake during the period 1960-1980. *Urol. Int.* 1982 ; 37 : 394 - 399.
- [15] R. Asper, Epidemiology and socioeconomic aspects of urolithiasis. *Urol Res* 1984 ; 12 : 1 - 5.
- [16] S. Ljunghall, B.G. Danielson, A prospective study of renal stone recurrences. *Br. J. Urol.* 1984 ; 56 : 122 - 124.
- [17] H.-J. Schneider, Epidemiology of Urolithiasis : Etiology · Diagnosis, *Handbook of Urology* 1985 ; 17 : 137-184.
- [18] M. Daudon, R.J. Réveillaud, Whewellite et weddellite : vers des étiopathogénies différentes. Intérêt du typage morphologique des calculs. *Néphrologie* 1984 ; 5 : 195 - 201.
- [19] M.C. Perrot, P. Montupet, F. Gauthier, J.P. Dommergues, J. Valayer, La lithiase urinaire de l'enfant : à propos de 92 cas. *Arch. Fr. Pédiatr.* 1985 ; 42 : 23 - 27.
- [20] M.H. Kheradpir, T. Armbruster, Childhood urolithiasis in Iran : a comparative study on the calculi composition of 121 cases. *Z. Kinderchir* 1985 ; 40 : 163-169.
- [21] S.A. Rizvi, S.A. Naqvi, Z. Hussain, S. Hahjehan, Renal stones in children in Pakistan. *Br. J. Urol.* 1985 ; 57 : 618 - 621.
- [22] M.F. Najjar, F. Najjar, K. Boukef, A. Oueslati, J. Memmi, T. Bechraoui, La lithiase infantile dans la région de Monastir. Etude clinique et biologique. *Le Biologiste* 1986 ; 20 : 253 - 261.
- [23] E. Takasaki, Chronological variation in the chemical composition of upper urinary tract calculi. *J. Urol.* 1986 ; 136 : 5 - 9.
- [24] P. Simon, K.S. Ang, G. Cam, C. Cloup, M. Carlier, J.P. Mignard et al. Épidémiologie de la lithiase calcique dans une région française : premiers résultats à 4 ans. *Presse Med.* 1986 ; 15 : 1665 - 1668.
- [25] S. Ljunghall, H. Lithell, E. Skarfors, Prevalence of renal stones in 60-year-old men. A 10-year follow-up study of a health survey. *Br J Urol* 1987 ; 60 : 10 - 13.
- [26] C. Economou, J. Thomas, G. Tobelem, G. Arvis, Prédominance gauche de la lithiase rénale. *Sem. Hop.* 1987 ; 63 : 277 - 280.
- [27] A.M. Dajani, A.L. Abu Khadra, F.M. Baghdadi, Urolithiasis in Jordanian children. *Br. J. Urol.* 1988 ; 61 : 482 - 486.
- [28] N.S. Mandel, G.S. Mandel, Urinary tract stone disease in the United States veteran population. II. Geographical analysis of variations in composition. *J. Urol.* 1989 ; 142 : 1516 - 1521.
- [29] T.W. Jones, T.R. Henderson, Urinary calculi in children in Western Australia: 1972-1986. *J. Aust. Paediatr.* 1989 ; 25 : 93 - 95.

- [30] D.B. Leusmann, R. Blaschke, W. Schmandt, Results of 5035 stone analysis: a contribution to epidemiology of stone disease. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1990 ; 24 : 205 - 214.
- [31] L. Borghi, P.P. Ferretti, G.F. Elia, F. Amato, E. Melloni, M.R. Trapassi et al. Epidemiological study of urinary tract stones in a northern Italian city. *Br. J. Urol.* 1990 ; 65 : 231 - 235.
- [32] O. Yoshida, Y. Okada, Epidemiology of urolithiasis in Japan: a chronological and geographical study. *Urol. Int.* 1990 ; 45 : 104 - 111.
- [33] P. Jungers, M. Daudon, Epidemiology of the kidney stones. *Presse Méd.* 1990 ; 19 : 1655 - 1657.
- [34] A. Ulmann, J. Clavel, D. Destree, C. Dubois, A. Mombet, J.M. Brisset, Histoire naturelle de la lithiase rénale calcique : données obtenues à partir d'une cohorte de 667 malades, *Presse Med.* 1991 ; 20 : 499 - 502.
- [35] M.J. Thun, S. Schober, Urolithiasis in Tennessee: an occupational window into a regional problem, *Am. J. Public Health* 1991 ; 81 : 587 - 591.
- [36] Y.H. Ni, Y.K. Tsau, C.H. Chen, T.C. Hsu, J.D. Lee, W.S. Tsai, Urolithiasis in children. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi* 1991; 32 : 9 - 16.
- [37] D. Prigent, A. Spiegel, S. Brodin, C. Gras, Etude de l'hyperuricémie à Tahiti. 31 cas hospitalisés au Centre Hospitalier Territorial de Papeete (Tahiti). *Med. Trop.* 1992 ; 52 : 63 - 66 .
- [38] C. Moesch, Données épidémiologiques, caractéristiques et évolution de la lithiase Urinaire, *Eurobiol.* 1993 ; 203 : 21 - 28.
- [39] J.M. Soucie, M.J. Thun, R.J. Coates, W. McClellan, H. Austin, Demographic and geographic variability of kidney stones in the United States. *Kidney Int.* 1994 ; 46 : 893 -899.
- [40] M. Daudon, R. Donsimoni, C. Hennequin, S. Fellahi, G. Le Moel, M. Paris, S. Troupel, B. Lacour, Sex- and age-related composition of 10617 calculi analyzed by I.R. Spectroscopy, *Urol. Res.* 1995 ; 23 : 319 - 325.
- [41] M. Daudon, L. Estépa, C. Hennequin, B. Lacour, P. Jungers, Evolution of urinary stone composition between 1980 and 1994 in France. In: Tiselius HG (ed) *Renal stones. Aspects on their formation, removal and prevention.* Akademityck AB, Edsbruk, 1995, pp 128 - 130.
- [42] S.A. Al-Rasheed , S.R. El-Faqih, I. Husain, M. Abdurrahman, M.M. Al-Mugeirin, The aetiological and clinical pattern of childhood urolithiasis in Saudi Arabia. *Int. Urol. Nephrol.* 1995 ; 27 : 349 - 355.
- [43] S. Nimmannit, P. Malasit, W. SUSAENGAT, S. Ong-Aj-Yooth, S. Vasuvattakul, P. Pidetcha, C. Shayakul, S. Nilwarangkur, Prevalence of endemic distal renal tubular acidosis and renal stone in the northeast of Thailand. *Nephron* 1996 ; 72 : 604 - 610.
- [44] J.M. Soucie, R.J. Coates, W. McClellan, H. Austin, M. Thum, Relation between geographic variability in kidney stones prevalence and risk factors for stones. *Am. J. Epid.* 1996 ; 143 : 487 - 495.
- [45] S. Ekane, T. Wildschutz, J. Simon, C.C. Schulman, Lithiase urinaire : épidémiologie et Physiopathologie, *Acta Urol. Belg.* 1997 ; 65 : 1 - 8.
- [46] D. Harrache, Z. Mesri, A. Addou, A. Semmoud, B. Lacour, M. Daudon : La lithiase urinaire chez l'enfant dans l'Ouest-Algérien. *Ann. Urol.* 1997 ; 31 : 84 - 88.
- [47] D. Harrache, Z. Mesri, A. Addou, A. Semmoud, B. Lacour, M. Daudon, Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans l'Ouest Algérien par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, *Eurobiol.* 1997 ; 31 : 69 - 74.
- [48] R. Donsimoni, C. Hennequin, S. Fellahi, S. Troupel, G.L. Moel, M. Paris et al. New aspects of urolithiasis in France. GERBAP: Groupe d'évaluation et de recherche des biologistes de l'Assistance publique des Hôpitaux de Paris. *Eur. Urol.* 1997 ; 31 : 17 - 23.
- [49] A. Hesse, R. Siener, Current aspects of epidemiology and nutrition in urinary stone Disease, *World Journal of Urology* 1997 ; 15 : 165 - 171.
- [50] A.A. Bala, A.M. Salah, A.H. Khattab, A. Kambal, D. Bongartz, B. Hope, A. Hesse, Mineral composition of renal stones from the Sudan. *Urol. Int.* 1998 ; 61 : 154 - 156.
- [51] C.S. Pundir, L. Goyal, M. Thakur, N.K. Kuchhal, A.K. Bhargava, S.P. Yadav, Chemical analysis of urinary calculi in Haryana. *Indian J. Med. Sci.* 1998 ; 52 : 16 - 21.
- [52] N. Rabasse, Lithiases urinaires au Laos : enquête épidémiologique à visée descriptive et étiologique. Collection des ouvrages du Comité de Coopération avec le Laos, Paris, SEGIP, 1998.
- [53] A. Kamoun, M. Daudon, ; J. Abdelmoula, M. Hamzaoui, B. Chaouachi, T. Houissa, A. Zghal, S. Ben Ammar, C. Belkahia, R. Lakhoua, Urolithiasis in Tunisian children : a study of 120 cases based on stone composition. *Pediatr. Nephrol.* 1999 ; 13 : 920 - 925.
- [54] M. Daudon, J. Amiel, Epidémiologie de la lithiase. *Prog Urol* 1999 ; 9 : 5 - 16.
- [55] S. Aegukkatajits, Reduction of urinary stone in children from north-eastern Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 1999 ; 82 : 1230 - 1233.
- [56] A. Serio, A. Fraioli, Epidemiology of nephrolithiasis. *Nephron* 1999 ; 81 : 26 - 30.
- [57] O. Yoshida, A. Terai, T. Ohkawa, Y. Okada, National trend of the incidence of urolithiasis in Japan from 1965 to 1995. *Kidney Int.* 1999 ; 56 : 1899 - 1904.

- [58] M. Daudon, L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant, *Arch. Pédi.* 2000 ; 7 : 855 – 865.
- [59] F.F. Angwafo III, M. Daudon, A. Wonkam, P.M. Kuwong, K.A. Kropp, Pediatric urolithiasis in sub Saharan Africa : A comparative study in two regions of Cameroon. *Eur. Urol.* 2000 ; 37 : 106 - 111.
- [60] A. Trinchieri, F. Coppi, E. Montanari, A. Del Nero, G. Zanetti, E. Pisani, Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. *Eur. Urol.* 2000 ; 37 : 23 - 25.
- [61] M.H. Gault, L. Chafe, Relationship of frequency, age and sex, stone weight and composition in 15,624 stones: comparison of results for 1980 to 1983 and 1995 to 1998, *J. Urol.* 2000 ; 164 : 302 - 311.
- [62] A. Oussama, F. Kzaiber, H. Hilmi, B. Merbari, A. Semmoud, M. Daudon, Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans le moyen Atlas marocain par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. *Prog. Urol.* 2000 ; 10 : 404 - 410.
- [63] F.M. Alapont Perez, J. Galvez Calderon, J. Varea Herrero, G. Colome Borros, A. Olaso, J.R. Sanchez Bisoño, Epidemiology of urinary lithiasis. *Actas Urol Esp* 2001 ; 25 : 341 - 349.
- [64] W.G. Robertson, The changing pattern of urolithiasis in the UK and its causes. In: Kok DJ, Romijn HC, Verhagen PCMS, Verkoelen CF (eds). *Eurolithiasis*. Shaker, Maastricht, 2001 , pp 9 - 15.
- [65] A. Sarkissian, A. Babloyan, N. Arikyants, A. Hesse, N. Blau, E. Leumann, Pediatric urolithiasis in Armenia : a study of 198 patients observed from 1991 to 1999. *Pediatr. Nephrol.* 2001 ; 16 : 728 - 732.
- [66] M. Decoster, J.C. Bogot, J.L. Carre, J.F. Morin, J.L. Mah, T. Tanquerel, J. Cleudes, H.H Floch, Etude épidémiologique des calculs urinaires dans l'ouest de la France. *Presse Méd.* 2002 ; 31 : 113 - 118.
- [67] S.A. Rizvi, S.A. Naqvi, Z. Hussain, A. Hashmi, M. Hussain, M.N. Zafar, S. Sultan, H. Medhi, Pediatric urolithiasis : developing nation perspectives. *J. Urol.* 2002 ; 168 : 1522 - 1525.
- [68] Y.H. Lee, W.C. Huang, J.Y. WC, J.Y. Tsai, C.M. Lu, W.C. Chen, M.H. Lee et al. Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urol. Int.* 2002 ; 68 : 172 - 177.
- [69] A. Hesse, E. Brandle, D. Wilbert, K.U. Kohrmann, P. Alken, Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000. *Eur. Urol.* 2003 ; 44 : 709 - 713.
- [70] K.K. Stamatelou, M.E. Francis, C.A. Jones, L.M. Nyberg, G.C. Curhan. Time trends in Reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney Int* 2003 ; 63 : 1817 - 1823.
- [71] W.G. Robertson, Stones in the tropics. *Semin Nephrol* 2003 ; 23 : 77 - 85.
- [72] R.S. Barsoum, End-stage renal disease in North Africa. *Kidney Int.* 2003 ; 83 : S111 - S114.
- [73] M. Jellouli, R. Jouini, M. Mekki, M. Belghith, M.F. Najjar, A. Nouri, Particularité de la lithiase urinaire du nourisson en Tunisie : A propos de 104 cas, *Prog. Urol.* 2004 ; 14 : 376 - 379.
- [74] M. Daudon, B. Bounxouei, F. Santa Cruz, D.A. Leite, S. Silva, B. Diouf et al. Composition des calculs observés aujourd'hui dans les pays non industrialisés. *Prog. Urol.* 2004 ; 14 : 1151 - 1161.
- [75] M. Daudon, J.C. Doré, P. Jungers, B. Lacour, Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach, *Urol. Res.* 2004 ; 32 : 241 - 247.
- [76] M. Daudon, P. Jungers, Drug-induced renal calculi - Epidemiology, prevention and management, *Drugs* 2004 ; 64 : 245 - 275.
- [77] M. Daudon, Épidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. *Ann Urol* 2005 ; 39 : 209 - 231.
- [78] M. Daudon, La lithiase de l'enfant a-t-elle évolué en France au cours des vingt dernières années, *Feuillets Biologique* 2005 ; 46 : 29 - 34.
- [79] P. Jungers, D. Joly, F. Barbey, G. Choukroun, M. Daudon, Insuffisance rénale terminale d'origine lithiasique : fréquence, causes et prévention, *Néphrologie & Thérapeutique* 2005 ; 1 : 301 - 310.
- [80] J.C. Lieske, L.S. Pena De La Vega, J.M. Slezak, E.J. Bergstralh, C.L. Leibson, K.L. Ho, et al. Renal stone epidemiology in Rochester, Minnesota: an update. *Kidney Int.* 2006 ; 69 : 760 - 764.
- [81] Z. Djelloul, A. Djelloul, A. Bedjaoui, Z. Kaid-Omar, A. Attar, M. Daudon et al. Lithiase urinaire dans l'Ouest Algérien : étude de la composition de 1354 calculs urinaires en relation avec leur localisation anatomique, l'âge et le sexe des patients. *Prog. Urol.* 2006 ; 16 : 328 - 235.
- [82] C.D. Scales, L.H. Curtis, R.D. Norris, P. Springhart, RL Sur, K.A. Schulman et al. Changing gender prevalence of stone disease. *J. Urol.* 2007 ; 177 : 979 - 982.
- [83] M. Daudon, G. Panteix, I. Sagnol, I. Petit, Caractéristiques épidémiologiques régionales de la lithiase urinaire en France. *Feuillets Biol* 2007 ; 48 : 45 - 51.
- [84] J. E. Dallera MD, P.S. Chandhoke, Epidemiology and Incidence of Stone Disease *Urinary Stone Disease, Current Clinical Urology* 2007, 27 - 34
- [85] M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevallier, C. Saussine, Épidémiologie des lithiases urinaires, *Progrès Urol.* 2008 ; 18 : 802 - 814.
- [86] S. Akoudad, M. Szklo, M.A. McAdams, T. Fulop, C.A.M. Anderson, J. Coresh, A. Köttgen, Correlates of kidney stone disease differ by race in a multi-ethnic middle- aged population: The ARIC study, *Preventive Medicine* 2010 ; 51 : 416 - 420.
- [87] A.G. Wasserstein, Epidemiology and Natural History of Nephrolithiasis,

- Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism 2011 ; 9 : 165 - 180.
- [88] F. Millán, S. Gracia, F.M. Sánchez-Martín, O. Angerri, F. Rousaud, H. Villavicencio, A new approach to urinary stone analysis according to the combination of the components : experience with 7,949 cases *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, 2011 ; 35 : 138 - 143.
- [89] E.S. Hyams, D. Nelms, W.S. Silberman, Z. Feng, B.R. Matlaga, The Incidence of urolithiasis among commercial aviation pilots, *The Journal of Urology* 2011 ; 186 : 914 - 916.
- [90] T.Y. Tseng, M.L. Stoller, Medical and Medical/Urologic Approaches in Acute and Chronic Urologic Stone Disease, Review Article, *Medical Clinics of North America* 2011 ; 95 : 169 - 177.
- [91] M. Daudon, K. Bertrand. Dossier : lithiase urinaire « Epidémiologie de la lithiase urinaire ». *La revue du praticien*. 2011 ; 61 : 371 - 394.
- [92] P. J. S. Osther, Epidemiology of Kidney Stones in the European Union, *Urolithiasis* 2012 pp 3 - 12
- [93] A. Dibi, F. Jabourik, A. Abouhafs, M. Kissra, M.N. Benhmamouch, A. Bentahila, Les lithiases urinaires chez l'enfant, *J. de Pédiatrie et de Puériculture* 2012 ; 25 : 91 - 96.
- [94] C.D. Scales Jr., A.C. Smith, J.M. Hanley, C.S. Saigal, Urologic Diseases in America Project Prevalence of Kidney Stones in the United States, *European Urology* 2012 ; 62 : 160 - 165.
- [95] M.E. Dwyer, A.E. Krambeck, E.J. Bergstralh, D.S. Milliner, J.C. Lieske, A.D. Rule Temporal Trends in Incidence of Kidney Stones Among Children: A 25-Year Population based study, *The Journal of Urology* 2012 ; 188 : 247 - 252.
- [96] G. Pourmand, B. Pourmand, Epidemiology of Stone Disease in Iran , *Urolithiasis* 2012 pp 85 - 87.
- [97] B. J. Linder, L.J. Rangel, A.E. Krambeck, The effect of work location on urolithiasis in health care Professionals, *Urolithiasis* 2013 ; 41 : 327 - 331.
- [98] M.L. Giannossi, V. Summa, An Observation on the Composition of Urinary Calculi: Environmental Influence *Medical Geochemistry* 2013 : 5 : 67 - 90.
- [99] K. Sarica, R.Horuz, Pediatric Stones, *Clinical Management of Urolithiasis* 2013 pp 133 - 154.
- [100] A. R. Aragón-Tovara, M. Á. Hernández-Farías, Crystallographic analysis of 475 urinary tract calculi at The Hospital San José Tec Salud in Monterrey, N. L., *Rev Mex Urol* 2013 ; 73 : 130 - 135.
- [101] F.A. Kaboré, T. Kambou, B. Zango, A. Ouattara, M. Simporté, C.L. Sorgho, E. Lechevalier, G. Karsenty, Épidémiologie d'une cohorte de 450 lithiases urinaires au CHU Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou (Burkina Faso) ; *Progrès en Urologie*, In Press, Corrected Proof ;
- [102] M. Daudon, D. Bazin, When the Synchrotron radiations highlight the Randall's plaques and kidney concretions. *J Phys: Conf series* 2013; 425: 022006
- [103] M. Daudon, Vitamine D, plaque de Randall et lithiase: existe-t-il un lien? *Arch Péd* 2013; 20: 336-340.
- [104] M. Daudon, Les calculs vésicaux en France : fréquence, origine, nature et physio-pathologie. In : *Proceedings des 17<sup>èmes</sup> Confrontations Clinico-Biologiques de l'Hôpital Necker sur la Lithiase Urinaire*, 2012, pp 65-71.

## Chapitre IV : Les éléments traces

### IV.1 Les éléments traces et le tissu biologique

En raison de leur rôle majeur dans les processus biologiques, la présence d'éléments traces dans les tissus biologiques constitue le cœur de nombreuses recherches et ce depuis plusieurs dizaines d'années [1-5]. Certains de ces éléments sont à risque de carence chez l'homme comme le Fe (pour le transport et le stockage de l'oxygène) [6,7], l'iode (présent dans les hormones thyroïdiennes) [8] ou le zinc et le cuivre (présents dans de nombreuses enzymes) [9]. Ceux-ci sont donc étudiés dans le cadre de certaines pathologies comme l'hémochromatose pour le Fer [10]. D'autres éléments sont associés à des toxicités importantes comme le Pb ou le Cd qui s'avèrent être de puissants néphrotoxiques. Ceux-ci définissent donc l'étiologie de la pathologie. Suite au bulletin émis par l'UNESCO [11], il convient de souligner qu'il persiste un fort doute pour certains éléments dont l'activité cancérogène est, à présent, seulement suspectée (F, Fe, Pb, Al) ainsi que pour d'autres éléments traces qui pourraient exercer une action protectrice aussi bien à des teneurs physiologiques qu'à des doses inférieures ou supérieures à la normale (I, Ca, Mg, Se, Zn). Notons que certains de ces éléments traces permettent d'aborder aussi les processus d'inflammation [12], les relations entre tissus et infections virales [13], les maladies cardiovasculaires [14], l'ostéoporose [15], les mélanomes [16] ou encore l'asthme [17].

Sur le plan expérimental, de nombreuses techniques sont capables d'apporter des informations essentielles sur la teneur en éléments traces mais aussi les états d'oxydation de ces éléments et leur localisation [18-22]. Parmi ces travaux, certains reposent sur des expériences de fluorescence X induite soit par des photons [23-27] soit par des protons [28-31]. Comme nous l'avons détaillé précédemment, ce type d'expériences permet de mettre en évidence non seulement des modulations de concentrations, et/ou de répartition spatiale d'éléments traces et/ou de leur spéciation mais aussi des corrélations spatiales entre éléments traces au sein des tissus biologiques dans le cadre de différentes pathologies. Plus précisément, la présence d'éléments traces a été étudiée dans plusieurs organes [33-34] comme le sein [35-37], le placenta [38], le foie [39-42], les poumons [43], les cartilages [44], les yeux [45], la peau [46] les cheveux [47], le cerveau [48], et bien sûr le rein [49]. Dans le cas de la prostate [50-55], certains auteurs ont tenté de relier la teneur en zinc à la présence de tumeurs. Dans le cas du cerveau, le lien entre la teneur en fer et la maladie de Parkinson a été

envisagé [56,57]. Les derniers développements s'attachent à effectuer ces mesures *in vivo* à des échelles subcellulaires tout en les combinant à d'autres techniques au sein d'une plateforme [58-67].

Des mesures par fluorescence X ont aussi été effectuées sur différents types de concrétions notamment des calculs biliaires [68-72], des calculs salivaires [73], des calcifications buccales [74], des calcifications du système vasculaire [75]. Une analyse rapide de la littérature montre que la majorité des recherches s'est concentrée sur l'étude des calculs rénaux et bien que de tels travaux ont été initiés dès les années 70, cette thématique est encore largement couverte comme le montrent tout un ensemble de publications récentes [76-91].

Une partie de cette recherche tend à mettre en évidence le rôle éventuel des éléments traces dans la pathogenèse de ces concrétions. Sur le plan physicochimique, nous avons vu que ceux-ci étaient capables de modifier les cinétiques de croissance mais aussi les morphologies des cristaux. Nous allons maintenant exposer l'ensemble de nos résultats et les comparer à une étude récente menée sur une cohorte de patients français.

## **IV.2 Résultats**

Les tableaux 1,2,3 rassemblent l'ensemble des mesures quantitatives obtenues par fluorescence X pour les éléments traces considérés (Cu, Zn, Se, Rb, Sr et Pb) sur 80 calculs provenant de l'est algérien. Sur le tableau 1, on remarque de suite que seuls le zinc, le strontium et le plomb sont associés à des teneurs supérieures à l'incertitude de la mesure. Celle-ci est intrinsèque au dispositif et égale à  $10\mu\text{g/g}$ . De fait, la teneur des autres éléments (Cu, Se et Rb) n'est pas présentée dans les autres tableaux (tableaux 2 et 3).

Dans le tableau 1, deux familles de calculs en fonction de la présence ou non de calcium sont considérées. Pour les calculs contenant du calcium, le zinc ( $238\pm 35\ \mu\text{g/g}$ ) et le strontium ( $165 \pm 56\mu\text{g/g}$ ) constituent des éléments prépondérants, la teneur en plomb est faible et proche finalement du seuil de détection ( $23\pm 4\ \mu\text{g/g}$  versus  $10\mu\text{g/g}$   $p<0.05$ ). Pour les calculs ne contenant pas de calcium, les teneurs en éléments traces sont dans l'ensemble bien plus faibles que pour les calculs contenant du calcium. Pour le Zn, on observe ainsi une teneur égale à  $235 \pm 15\mu\text{g/g}$  pour les calculs contenant du calcium versus  $15\pm 73\ \mu\text{g/g}$  pour les calculs n'en contenant pas ( $p<0.01$ ).

**Tableau 1:** Éléments traces présents dans les calculs calciques et non calciques (en  $\mu\text{g/g} \pm$  écart type)

Composant Principal	Nb	Cu	Zn	Se	Rb	Sr	Pb
Calculs calciques	62	29 $\pm$ 3	238 $\pm$ 35	<10	<10	165 $\pm$ 56	23 $\pm$ 4
Calculs calciques [92]	43	<10	525 $\pm$ 768	<10	<10	239 $\pm$ 300	19 $\pm$ 27
Calculs non calciques	14	24 $\pm$ 6	15 $\pm$ 73**	<10	<10	<10	<10 $\pm$ 9*
Calculs non calciques [92]	35	<10	33 $\pm$ 70	<10	<10	24 $\pm$ 52	<10

\*p<0.05 ; \*\* p<0.01 versus calcique

Parmi les calculs calciques, il convient de différencier les calculs formés d'oxalate et ceux formés de phosphates calciques (Tableau 2). Ces mesures montrent que les premiers contiennent nettement moins d'éléments traces que les seconds. Ainsi pour les teneurs de Zn, on mesure 123 $\mu\text{g/g}$  pour les oxalates de calcium versus 440  $\mu\text{g/g}$  pour les phosphates ( $p=0,0019$ ). De même pour le Sr, dont la teneur atteint en moyenne 870  $\mu\text{g/g}$  dans les calculs phosphocalciques contre seulement 32  $\mu\text{g/g}$  pour les calculs oxalocalciques,  $p < 0,0001$ ).

**Tableau 2:** Éléments traces présents dans les calculs urinaires calciques (en  $\mu\text{g/g} \pm$  écart type).

Composant Principal	Nb	Zn	Sr	Pb
Oxalate de Ca	37	123 $\pm$ 42	32 $\pm$ 74	17 $\pm$ 3
Oxalate de Ca [92]	19	95 $\pm$ 176	74 $\pm$ 56	12 $\pm$ 9
CA	9	440 $\pm$ 71*	870 $\pm$ 123**	11 $\pm$ 10
CA [92]	18	1059 $\pm$ 934	455 $\pm$ 364	31 $\pm$ 39

\*p = 0.0019; \*\* p < 0,00001 vs oxalate de calcium

Cette observation est valable pour l'ensemble des éléments traces. S'il existe quelques différences entre cette étude et l'étude précédente [92], l'un des points clés de ces mesures s'associe à la différence significative observée dans les deux études entre les deux oxalates de calcium i.e. monohydraté et dihydraté. En effet, comme le montre le tableau 3, la teneur en éléments-traces de la whewellite est significativement inférieure à celle observée pour la weddellite, aussi bien pour le plomb (13  $\pm$  4  $\mu\text{g/g}$  versus 31  $\pm$  8  $\mu\text{g/g}$  pour la weddellite,  $p = 0,05$ ) que pour le zinc (66  $\pm$  24  $\mu\text{g/g}$  versus 440  $\pm$  53  $\mu\text{g/g}$  pour la weddellite,  $p < 0,00001$ ) et, plus encore pour le strontium (7  $\pm$  8  $\mu\text{g/g}$  versus 138  $\pm$  18  $\mu\text{g/g}$ ,  $p < 0,000001$ ).

**Tableau 3:** Éléments traces présents dans les calculs urinaires calciques (en  $\mu\text{g/g} \pm \text{écart type}$ ).

Composant Principal	Nb	Zn	Sr	Pb
C1	25	66 $\pm$ 24	7 $\pm$ 8	13 $\pm$ 4
Whewellite [92]	15	42 $\pm$ 38	61 $\pm$ 41	12 $\pm$ 10
C2	5	440 $\pm$ 53 <sup>xx</sup>	138 $\pm$ 18 <sup>xx</sup>	31 $\pm$ 8 <sup>x</sup>
Weddellite [92]	4	290 $\pm$ 346	125 $\pm$ 82	14 $\pm$ 4
C1+C2	7	100 $\pm$ 80	46 $\pm$ 139	24 $\pm$ 11
C1+C2+CA	8	520 $\pm$ 75 <sup>**</sup>	116 $\pm$ 130 <sup>*</sup>	71 $\pm$ 10 <sup>***</sup>
C1+CA	3	83 $\pm$ 122	14 $\pm$ 213	9 $\pm$ 17
C2+CA	3	589 $\pm$ 122	81 $\pm$ 208	27 $\pm$ 17

<sup>x</sup> p=0,05; <sup>xx</sup> p < 0,00001; <sup>xxx</sup> p < 0,000001 versus C1

\* p<0.0001 versus C1; \*\* p<0.001 versus C1+C2 ; \*\*\* p<0.05 versus C1

### IV.3 Discussion

Dans le tableau 1, on compare les teneurs mesurées pour les éléments traces entre calculs calciques et calculs non calciques. On observe des teneurs plus élevées pour les calculs calciques. Ainsi, pour le Zn, on mesure une valeur égale à 238 $\pm$ 35 $\mu\text{g/g}$  pour les calculs calciques et à 15 $\pm$ 73 $\mu\text{g/g}$  pour les calculs non calciques ( $p < 0.01$ ). De même, pour le plomb, on mesure une valeur égale à 23 $\pm$ 4 $\mu\text{g/g}$  pour les calculs calciques et à 10 $\pm$ 9 $\mu\text{g/g}$  pour les calculs non calciques ( $p < 0.05$ ). Ces mesures sont cohérentes avec un schéma général où les éléments traces viennent se substituer simplement au calcium. Cette substitution s'effectue d'autant plus facilement que l'on respecte les règles de Goldschmidt. En effet, les éléments traces se présentent comme le calcium sous la forme de cations doublement chargés ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) avec des rayons ioniques relativement proches du calcium ( $R(\text{Ca}^{2+}) = 0.099\text{nm}$ ;  $R(\text{Zn}^{2+}) = 0.074\text{nm}$ ,  $R(\text{Sr}^{2+}) = 0.113\text{nm}$ ,  $R(\text{Pb}^{2+}) = 0.132\text{nm}$ ).

Dans le deuxième tableau, on distingue au sein des calculs calciques, les oxalates et les phosphates. Les teneurs s'avèrent très différentes entre ces deux types de calculs calciques pour le zinc et le strontium. Ainsi pour les oxalates de calcium et les phosphates calciques, la mesure donne respectivement pour le zinc 123  $\pm$  42  $\mu\text{g/g}$  et 440  $\pm$  71  $\mu\text{g/g}$ ,  $p = 0,0019$ ) et pour le Sr 32  $\pm$  74  $\mu\text{g/g}$  et 870  $\pm$  123  $\mu\text{g/g}$ ,  $p < 0,00001$ ). Cette différence est liée à l'une des particularités de la structure apatitique, sa capacité à former des solutions solides et à accepter

un grand nombre de substituants. Ainsi, les cations bivalents  $\text{Ca}^{2+}$  de l'hydroxyapatite peuvent être remplacés par d'autres cations bivalents ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ...) [93], mais aussi par des cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ...), trivalents ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ...) ou des lacunes ( $\square$ ).

Dans le troisième tableau, on retrouve le fait que la weddellite contient bien plus d'éléments traces que la whewellite. L'explication qui avait été avancée repose sur la conversion cristalline de la weddellite en whewellite au cours de laquelle un relargage des éléments traces est effectuée. Ce relargage réduit de facto la teneur des éléments traces dans les calculs composés de whewellite. Pour le strontium, une explication supplémentaire est possible puisque la weddellite est une espèce calcium dépendante associée à des hypercalciuries et l'on sait par ailleurs que les cations  $\text{Sr}^{2+}$  suivent les voies métaboliques du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Finalement, pour le plomb, on remarque que les teneurs sont peu élevées, ce qui suggère que la population n'est pas particulièrement exposée à un environnement riche en plomb par le biais de canalisations en plomb.

## Références

- [1] V. Hudnik, M. Marlot-Gomiscek, S. Gomiscek, The determination of trace metals in human fluids and tissues. Part 3. *Anal. Chim. Acta.* 1984 ; 157 : 303-311.
- [2] W.H. Cherry, Data analysis of trace-element levels in human tissues. *Tot. Environ.* 1984 ; 34 : 199 - 201.
- [3] J. Versieck, Trace elements in human body fluids and tissues. *CRC Rev. Clin. Lab. Sci.* 1985 ; 22 : 97 - 184.
- [4] S. Lugowski, D.C. Smith, J.C. VanLoon, Critical aspects of trace element analysis of tissue samples: A review, *Clinical Mat.* 1990 ; 6 : 91 - 104.
- [5] Y. Rayssiguier, A. Mazur, Trace Elements in Man and Animals in *Trace Elements 2002*, pp 97-103.
- [6] O. Loréal, É. Bardou-Jacquet, M.-L. Island, N. Fatih, M. Doyard, L. Detivaud, P. Brissot, *Métabolisme du fer*, *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 2012 ; 47 : 117 - 124.
- [7] E. Bárány, I.A. Bergdahl, L.-E. Bratteby, T. Lundh, G. Samuelson, S. Skerfving, A. Oskarsson, Iron status influences trace element levels in human blood and serum, *Env. Res.* 2005 ; 98 : 215 - 223.
- [8] M. Hansson, G. Berg, M. Isaksson, Chap. 3 - Determination of Iodine In Vivo and In Vitro by X-Ray Fluorescence Analysis: Methodology and Applications, *Comprehensive Handbook of I 2009* pp 29-37.
- [9] B. Bao, A.S. Prasad, F.W. Beck, et al. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl. Res.* 2008 ; 152 : 67 - 80.
- [10] W. Osterode, G. Falkenberg, R. Höftberger, F. Wrba, Fe, Cu, Zn and Br mapping in cirrhotic liver slices from patients with hemochromatosis studied by microscopic S.R. X-ray fluorescence analysis in continuous scanning mode, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2007 ; 62 : 682 - 688.
- [11] Bulletin Unesco, 211-05 newsletter n°9 fran 5/04/05 12:28 Page 1.
- [12] X. Carpentier, D. Bazin, C. Combes et al. High Zn content of Randall's plaque : A  $\mu$ -X-ray fluorescence investigation. *J Trace Elements Med. Biol.* 2011; 25 : 160 - 165.
- [13] M. N. Rashed, The role of trace elements on hepatitis virus infections: A review, *J. of Trace Elements in Medicine and Biol.* 2011 ; 25 : 181 - 187.
- [14] E. Altekin, C. Çoker, A. Rıza Şişman, B. Önvural, F. Kuralay, Ö. Kırımlı, The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary Syndromes, *J. of Trace Elements in Medicine and Biol.* 2005 ; 18 : 235 - 242.
- [15] J. Aaseth, G. Boivin, O. Andersen, Osteoporosis and trace elements – An overview *J. of Trace Elements in Medicine and Biol.* 2012 ; 26 : 149 - 152.
- [16] M. Bergomi, G. Pellacani, M. Vinceti, S. Bassissi, C. Malagoli, D. Alber, S. Sieri, L. Vescovi, S. Seidenari, R. Vivoli, Trace elements and melanoma, *J. of Trace El. in Med. Biol.* 2005 ; 19 : 69 - 73.
- [17] A. Kocyigit, F. Armutcu, A. Gurel, B. Ermis, Alterations in plasma essential trace elements selenium, manganese, zinc, copper, and iron concentrations and the possible role of these elements on oxidative status in patients with childhood asthma, *Biological Trace Element Research* 2004 ; 97 : 31 - 41.
- [18] P. Schramel, ICP and DCP emission spectrometry for trace element analysis in biomedical and environmental samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1988 ; 43 : 881 - 896.
- [19] B. Smodiš, Investigation of trace element atmospheric pollution by nuclear analytical techniques at a global scale: Harmonised approaches supported by the IAEA, *J. of Environmental Management* 2007 ; 85 : 121 - 128.
- [20] R.J.C. Brown, M. J.T. Milton, Analytical techniques for trace element analysis: an Overview *Trends in Analytical Chem.* 2005 ; 24 : 266 - 274.
- [21] G. Vaggelli, A. Borghi, R. Cossio, C. Mazzoli, F. Olmi, Comparison between major and trace element concentrations in garnet performed by EPMA and micro-PIXE techniques, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2003 ; 58 : 699 - 709.
- [22] E.B. González, A. Sanz-Medel, Chapter 4 Liquid chromatographic techniques for trace element speciation analysis, *Comprehensive Analytical Chemistry* 2000 ; 33 : 81 - 121.
- [23] M.F. Lubozynski, R.J. Baglan, G.R. Dyer, A.B. Brill, Sensitivity of X-ray fluorescence for trace element determinations in biological tissues, *Int. J. of Applied Radiation and Isotopes* 1972 ; 23 : 487 - 491.
- [24] Ch. J Fahrni, Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals, *Current Opinion in Chemical Biol.* 2007 ; 11 : 121 - 127.
- [25] L. Benninghoff, D. von Czarnowski, E. Denkhau, K. Lemke, Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 1997 ; 52 : 1039 - 1046.
- [26] R. Lobinski, C. Moulin, R. Ortega, Imaging and speciation of trace elements in biological environment, *Biochimie* 2006 ; 88 : 1591 - 1604.
- [27] R. Cesareo, Biomedical applications of photon-induced X-ray fluorescence, *Biological Trace Element Res.* 1987 ; 13 : 371 - 382.

- [28] M.L. Carvalho, T. Magalhães, M. Becker, A. von Bohlen, Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE, *Spectrochimica Acta Part B* 2007 ; 62 : 1004 - 1011.
- [29] R.A. Kumar, V.J. Kennedy, K. Sasikala, A.L.C. Jude, M. Ashok, Ph. Moretto, Trace element analysis of blood samples from mentally challenged children by PIXE, *NIM B* 2002 ; 190 : 449 - 452.
- [30] H. Oudadesse, G. Guibert, E. Chassot, J.L. Irigaray, S. Terver, G. Vanneville, Y. Tessier, T. Sauvage, G. Blondiaux, Study by PIXE method of trace elements transferred from prostheses to soft tissues and organs, *NIM B* 2002 ; 190 : 445 - 448.
- [31] S. Gödény, I. Borbély-Kiss, E. Koltay, S. László, G. Szabó, Determination of trace and bulk elements in plasma and erythrocytes of diabetic pregnant women by PIXE method *Int. J. of Gynecology & Obstetrics* 1986 ; 24 : 201 - 207.
- [32] T. Magalhães, M.L. Carvalho, A. Von Bohlen, M. Becker, Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2010 ; 65 : 493 - 498.
- [33] D. von Czarnowski, E. Denkhaus, K. Lemke, Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis, *Spectrochimica Acta Part B* 1997 ; 52 : 1047 - 1052.
- [34] W. Osterode, G. Falkenberg, R. Höftberger, F. Wrba, Iron, copper, zinc and bromine mapping in cirrhotic liver slices from patients with hemochromatosis studied by microscopic synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis in continuous scanning mode, *Spectrochimica Acta Part B* 2007 ; 62 : 682 - 688.
- [35] M. Piacenti da Silva, O.L.A. D. Zucchi, A. Ribeiro-Silva, M. E. Poletti, Discriminant analysis of trace elements in normal, benign and malignant breast tissues measured by total reflection X-ray fluorescence *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2009 ; 64 : 587 - 592.
- [36] K. Geraki, M.J. Farquharson, An X-ray fluorescence system for measuring trace element concentrations in breast Tissue, *Radiation Physics and Chemistry* 2001 ; 61 : 603 - 605.
- [37] M.J. Farquharson, K. Geraki, G. Falkenberg, R. Leek, A. Harris, The localisation and micro-mapping of copper and other trace elements in breast tumours using a synchrotron micro-XRF system, *Applied Radiation and Isotopes* 2007 ; 65 : 183 - 188.
- [38] Y. Özdemir, B. Börekci, A. Levet, M. Kurudirek, Assessment of trace element concentration distribution in human placenta by wavelength dispersive X-ray fluorescence: Effect of neonate weight and maternal age, *Applied Radiation and Isotopes* 2009 ; 67 : 1790 - 1795.
- [39] K. Gurusamy, B.R. Davidson, Trace element concentration in metastatic liver disease – A systematic review, *J. of Trace Elements in Medicine and Biology* 2007 ; 21 : 169 - 177.
- [40] F. Le Naour, Ch. Sandt, Ch. Peng, N. Trcera, F. Chiappini, A.-M. Flank, C. Guettier, P. Dumas, In Situ chemical composition analysis of cirrhosis by combining Synchrotron Fourier transform infrared and Synchrotron X-ray Fluorescence Microspectroscopies on the same tissue section, *Anal. Chem.* 2012 ; 84 : 10260 - 10266.
- [41] R. Zeisler, R. R. Greenberg, S. F. Stone, Radiochemical and instrumental neutron activation analysis procedures for the determination of low level trace elements in human livers, *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1988 ; 124 : 47 - 63.
- [42] A. Al-Ebraheem, M.J. Farquharson, E. Ryan, The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue, *Applied Radiation and Isotopes* 2009 ; 67 : 470 - 474.
- [43] A. Kubala-Kukuś, J. Braziewicz, D. Banaś, U. Majewska, S. Gózdź, A. Urbaniak, Trace element load in cancer and normal lung tissue, *NIM B* 1999 ; 150 : 193 - 199.
- [44] A. Dessombz, Ch. Nguyen, H.-K. Ea, S. Rouzière, E. Foy, D. Hannouche, S. Réguer, F.-E. Picca, D. Thiaudière, F. Lioté, M. Daudon, D. Bazin, Combining  $\mu$ X-ray fluorescence,  $\mu$ XANES and  $\mu$ XRD to shed light on  $Zn^{2+}$  cations in cartilage and meniscus calcifications, *J. of Trace El. in Med. Biol.* In Press.
- [45] T. R. Jones, T. W. Reid, Trace Elements in the Eye, *Pharmacology of the Eye, Handbook of Experimental Pharmacology* 1984 ; 69 : 667 - 685.
- [46] D. A. Bradley, M. J. Farquharson, X-Ray Fluorescence and the In Vivo Evaluation of Fe, Cu and Zn in Skin, *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2000 ; 244 : 213 - 217.
- [47] N. Saitoh, T. Suzuki, T. Kishi, A. Iida, Y. Gohshi, Comparison of SR-excited X-ray fluorescence analysis with neutron activation analysis for hair and fiber, *Biological Trace Element Research* 1987 ; 12 : 211 - 220.
- [48] S.A. James, D. E. Myers, M.D. de Jonge, S. Vogt, C.G. Ryan, B.A. Sexton, P. Hoobin, D. Paterson, D. L. Howard, S. C. Mayo, Quantitative comparison of preparation methodologies for x-ray fluorescence microscopy of brain tissue, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011 ; 401 : 853 - 864.
- [49] X. Carpentier, D. Bazin, Ch. Combes, A. Mazouyes, S. Rouzière, P. A. Albouy, E. Foy,

- M. Daudon, High Zn content of Randall's plaque: A  $\mu$ -X-ray fluorescence investigation  
*J. of Trace Elements in Medicine and Biol.* 2011 ; 25 : 160 - 165.
- [50] V. Ye. Zaichick, T. V. Sviridova, S. V. Zaichick, Zinc in the human prostate gland :  
 Normal, hyperplastic and Cancerous, *Internat. Urology and Nephrology* 1997 ; 29 : 565 - 574.
- [51] A. Banas, W. M. Kwiatek, K. Banas, M. Gajda, B. Pawlicki, T. Cichocki, Correlation of  
 concentrations of selected trace elements with Gleason grade of prostate tissues,  
*J. of Biological Inorganic Chem.* 2010 ; 15 : 1147 - 1155.
- [52] A. Banas, K. Banas, W. M. Kwiatek, M. Gajda, B. Pawlicki, T. Cichocki, Neoplastic  
 disorders of prostate glands in the light of synchrotron radiation and multivariate  
 statistical analysis, *J. of Biological Inorganic Chem.* 2011 ; 16 : 1187 - 1196.
- [53] L.C. Costello, R. B. Franklin, Zinc is decreased in prostate cancer: an established  
 relationship of prostate cancer, *J. of Biological Inorganic Chemistry* 2011 ; 16 : 3 - 8.
- [54] G.R. Pereira, H.S. Rocha, M.J. Anjos, I. Lima, R.T. Lopes, Elemental distribution  
 images in prostate samples by X-ray fluorescence microtomography,  
*Applied Radiation and Isotopes*, 2012 ; 70 : 1379 - 1383.
- [55] R.G. Leitão, A. Palumbo Jr., P.A.V.R. Souza, G.R. Pereira, C.G.L. Canellas,  
 M.J. Anjos, L.E. Nasciutti, R.T. Lopes, Elemental concentration analysis in prostate  
 tissues using total reflection X-ray fluorescence, *Radiation Physics and Chemistry*, In Press .
- [56] E. Kienzl, L. Puchinger, K. Jellinger, W. Linert, H. Stachelberger, R. F. Jameson,  
 The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease,  
*J. of the Neurological Sciences* 1995 ; 134 : 69 - 78.
- [57] J. Chwiej, The use of cluster and discriminant analysis in the investigations of the role  
 of trace metals in the pathogenesis of Parkinson's disease,  
*J. of Trace Elements in Medicine and Biol.* 2010 ; 24 : 78 - 88.
- [58] B.M. Gordon, A.L. Hanson, K.W. Jones, J.G. Pounds, M.L. Rivers, G. Schidlovsky,  
 P. Spanne, S.R. Sutton, The application of synchrotron radiation to microprobe trace  
 -element analysis of biological samples, *NIM B* 1990 ; 45 : 527 - 531.
- [59] V. Zaichick, N. Ovchjarenko, S. Zaichick, In vivo energy dispersive X-ray fluorescence  
 for measuring the content of essential and toxic trace elements in teeth,  
*Applied Radiation and Isotopes*, 1999 ; 50 : 283 - 293.
- [60] L. Gerhardsson, V. Englyst, N.-G. Lundström, S. Sandberg, G. Nordberg, Cadmium,  
 copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers,  
*J. of Trace Elements in Medicine and Biol.* 2002 ; 16 : 261 - 266.
- [61] P. Suortti, W. Thomlinson W, Medical applications of synchrotron radiation.  
*Phys Med Biol* 2003; 48 : R1 - R35.
- [62] M. Lankosz, M. Szczerbowska-Boruchowska, J. Chwiej, Research in quantitative  
 microscopic X- ray fluorescence analysis, *Spectrochimica Acta Part B* 2004 ; 59 : 1517 - 1521.
- [63] S. Bohic, K. Murphy, W. Paulus, P. Cloetens, M. Salomé, J. Susini, K. Double,  
 Intracellular Chemical Imaging of the Developmental Phases of Human Neuromelanin  
 Using Synchrotron X-ray Microspectroscopy, *Anal. Chem.* 2008 ; 80 : 9557 - 9566.
- [64] R. McRae, P. Bagchi, S. Sumalekshmy, C.J. Fahrni, In Situ Imaging of Metals in Cells  
 and Tissues, *Chem. Rev.* 2009 ; 109 : 4780 - 4827.
- [65] B. Fayard, M. Salomé, K. Takemoto, H. Kihara, J. Susini, Some practical  
 considerations about the effects of radiation damage on hydrated cells imaged by X-ray  
 fluorescence microscopy.  
*J Electron Spectrosc Related Phenomena* 2009 ; 170 : 19 - 24.
- [66] H.-Y. N. Holman, H.A. Bechtel, Z. Hao, M. C. Martin, Synchrotron IR  
 spectromicroscopy: chemistry of living Cells, *Anal. Chem.* 2010 ; 82 : 8757 - 8765.
- [67] R.T. Lopes, I. Lima, G.R. Pereira, C.A. Perez, Synchrotron radiation X-ray microfluorescence techniques  
 and biological Applications, *Pramana* 2011 ; 76 : 271 - 279.
- [68] F. A. El-Amri, G. A. Barouni, Trace element concentration in human gallstones using  
 instrumental neutron activation analysis, *J. of Rad. and Nuclear Chemistry* 1993 ; 174 : 29 - 33.
- [69] K. Shizuma, K. Iwatani, H. Hasai, S. Hamanaka, X.Q. Wen, I. Horiuchi, G. Kajiyama,  
 PIXE analysis of gallstones: trace element analysis and millibeam scanning of stone  
 sections, *NIM B* 1997 ; 129 : 401 - 409.
- [70] N. Ekinici, Y. Yusuf, Determination of calcium and iodine in gall bladder stone using  
 energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry  
*Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy*, 2002 ; 57 : 167 - 171.
- [71] M. Ashok, T. R. Rautray, Pranaba K. Nayak, V. Vijayan, V. Jayanthi, S.N. Kalkura, Energy dispersive

- X-ray fluorescence analysis of gallstones, *J. of Radioanal. and Nuclear Chemistry* 2003 ; 257 : 333 – 335.
- [72] T. Kodaka, T. Sano, K. Nakagawa, J. Kakino, R. Mori, Structural and analytical comparison of gallbladder stones collected from a single patient: studies of five cases, *Med. El. Mic.* 2004 ; 37 : 130 - 140.
- [73] O. A. Golovanova, L. V. Bel'skaya, N. Yu. Berezina, Quantitative spectral trace element analysis of pathogenic biominerals from residents of the Omsk region, *J. of Applied Spectr.* 2006 ;73 : 886 - 891.
- [74] J. Abraham, M. Grenon, H. J. Sanchez, C. A. Pérez, R. A. Barrea, Spectrochemical Analysis of Dental Calculus by S.R. X-ray Fluorescence, *Anal. Chem.* 2002, 74, 324 - 329.
- [75] C.L. Cheng, H.-H. Chang, P.-J. Huang, Y.-T. Chu, S.-Y. Lin, Composition and Distribution of Elements and Ultrastructural Topography of a Human Cardiac Calculus, *Biological Trace Element Research* 2013 ;152 : 143 - 151.
- [76] I. Donev, S. Mashkarov, L. Maritchkova, G. Gotsev, Quantitative investigation of some trace elements in renal stones by neutron activation analysis, *J. of Rad. Chem.* 1977 ; 37 : 441 - 449.
- [77] R. Scott, B. W. East, J. Janczyszyn, K. Boddy, A. J. Yates, Concentration and distribution of some minor and trace elements in urinary tract stones: A preliminary study, *Urological Research* 1980 ; 8 : 167 - 169.
- [78] S.M. Lin, C. H. Chiang, C. H. Huang, C. L. Tseng, M. H. Yang, Instrumental neutron activation analysis of urinary Calculi, *J. of Radioanal. and Nuclear Chem.* 1985 ; 96 : 153 - 160.
- [79] S.M. Lin, C.L. Tseng, M.H. Yang, Determination of major, minor and trace elements in urinary stones by neutron activation analysis, *Int. J. of Rad. Applications and Instrumentation. Part A.* 1987 ; 38 : 635-639.
- [80] S. Galassini, N.Q. Liu, G. Moschini, A. Tasca, G. Villi, V. Valkovic, Trace element variability in kidney stones, *NIM B* 1989 ; 43 : 556 - 559.
- [81] C. Paluszkiwicz, W.M. Kwiatek, M. Gazla, Trace element relations to renal stones Phases, *NIM B* 1990 ; 49 : 234 - 237.
- [82] I. Durak, M. Akpoyraz, A. Sahin, Sodium, potassium and chloride concentrations in the inner nucleus and outer crust parts of urinary tract calculi, *Int. Urology and Nephro.* 1991 ; 23 : 221 - 226.
- [83] I. Durak, Z. Kilic, A. Sahin, M. Akpoyraz, Analysis of calcium, iron, copper and zinc contents of nucleus and crust parts of urinary calculi, *Urological Research* 1992 ; 20 : 23 - 26.
- [84] C. Koeberl, P. M. Bayer, K. Höbarth, Determination of rare earth and other trace element abundances in human kidney stones and brain tissue by instrumental neutron activation analysis, *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1993 ; 169 : 269-276.
- [85] N. A. Pal'chik, T. N. Moroz, N. V. Maksimova, A. V. Dar'in, Mineral and microelement compositions of urinary Stones, *Russian Journal of Inorganic Chemistry* 2006 ; 51 : 1098 - 1105.
- [86] M. A. Chaudhri, J. Watling, F. A. Khan, Spatial distribution of major and trace elements in bladder and kidney Stones, *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2007 ; 271 : 713 - 720.
- [87] M. Słojewski, B. Czerny, K. Safranow, M. Drożdżik, A. Pawlik, K. Jakubowska, M. Olszewska, A. Gołąb, E. Byra, D. Chlubek, Does smoking have any effect on urinary stone composition and the distribution of trace elements in urine and stones? *Urological Research* 2009 ; 37 : 317 - 322.
- [88] A. Srivastava, K. K. Swain, N. Ajith, D. N. Wagh, R. Acharya, A. V. R. Reddy, U. Mete, Trace element study of kidney stones from subjects belonging to stone belt region of India, *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2012 ; 294 : 425 - 428.
- [89] A. Hesse, R. Siener, Trace Elements in Urolithiasis, *Urolithiasis* 2012, pp 227-230.
- [90] M. L. Giannossi, V. Summa, G. Mongelli, Trace element investigations in urinary stones: A preliminary pilot case in Basilicata (Southern Italy), *J. of Trace Elements in Med. and Biology*, 2013 ; 27 : 91 - 97.
- [91] A. Zarasvandi, M. Heidari, M. Sadeghi, E. Mousapoor, Major and trace element composition of urinary stones, Khuzestan province, southwest, Iran, *J. of Geochemical Exploration*, 2013 ; 131 : 52 - 58.
- [92] D. Bazin, P. Chevallier, G. Matzen, P. Jungers, M. Daudon, Heavy elements in urinary Stones, *Urol Res* 2007 ; 35 : 179 - 184.
- [93] D. Marchat, Thèse "Fixation du Cd par une hydroxyapatite phosphocalciques (Etude cinétique et thermodynamique), Université de Limoges, 2005.

## Chapitre V : Effet des plantes médicinales

Ce chapitre reprend l'article publié dans Progrès en urologie [1] et se complète par des données supplémentaires obtenues récemment. Comme nous l'avons vu dans le chapitre IIIA, les données épidémiologiques montrent que plus de 80 % des calculs sont composés principalement d'oxalate de calcium (CaOx) et sont associés dans la plupart des cas à des désordres nutritionnels [2,3]. De ce fait, l'utilisation des extraits de plantes, essentiellement dirigées contre cette lithiase oxalocalcique, a fait l'objet de diverses publications [4,5]. En revanche, très peu de travaux se sont intéressés à des lithiases plus rares [6-9], posant souvent plus de problèmes de prise en charge, telles que la lithiase cystinique [10].

Nous avons choisi d'étudier l'effet d'extraits de plantes sur les calculs rénaux de cystine. Ces calculs, qui résultent d'une tubulopathie héréditaire, la cystinurie lysinurie [11-32], sont particulièrement récidivants et nécessitent de multiples interventions urologiques. Différents traitements sont utilisés pour lutter contre la formation de ces calculs [33-39] : cure de diurèse, alcalinisation des urines, médicaments porteurs d'un groupe thiol capables de former des complexes avec la cystine [40,41].

Cependant, un tel traitement médical est souvent mal toléré avec un taux élevé d'effets secondaires. En ce qui concerne les plantes médicinales proposées contre les calculs de cystine, une seule étude, publiée récemment dans cette revue, a montré *in vitro* que les extraits de *Zea mays*, *Ammi visnaga*, *Herniaria hirsuta* et *Opuntia ficus-indica* étaient capables de dissoudre les calculs de cystine en quelques semaines [7].

Le but de cette étude a été d'évaluer les effets solvants d'autres plantes incluant *Arenaria ammophila* (tiges et feuilles), les feuilles de *Parietaria officinalis*, les fleurs de *P. officinalis*, et les fleurs de *Paronychia Argentea* déjà utilisées en médecine traditionnelle contre la lithiase rénale. Pour ce faire, nous avons suivi *ex vivo* la variation de masse des calculs et les modifications structurales éventuelles à l'échelle mésoscopique par observation des calculs à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) au cours de la même période d'incubation que celle utilisée dans l'étude précédente, soit huit semaines [7]. Nous avons complété ces observations par des mesures du pH de la solution afin de discuter l'effet de ce paramètre sur une dissolution éventuelle.

### V.1 Échantillonnage

Quinze calculs rénaux de cystine pure provenant de la clinique rénale de Daksi-Constantine (Algérie) ont été sélectionnés par examen en microscopie binoculaire et après

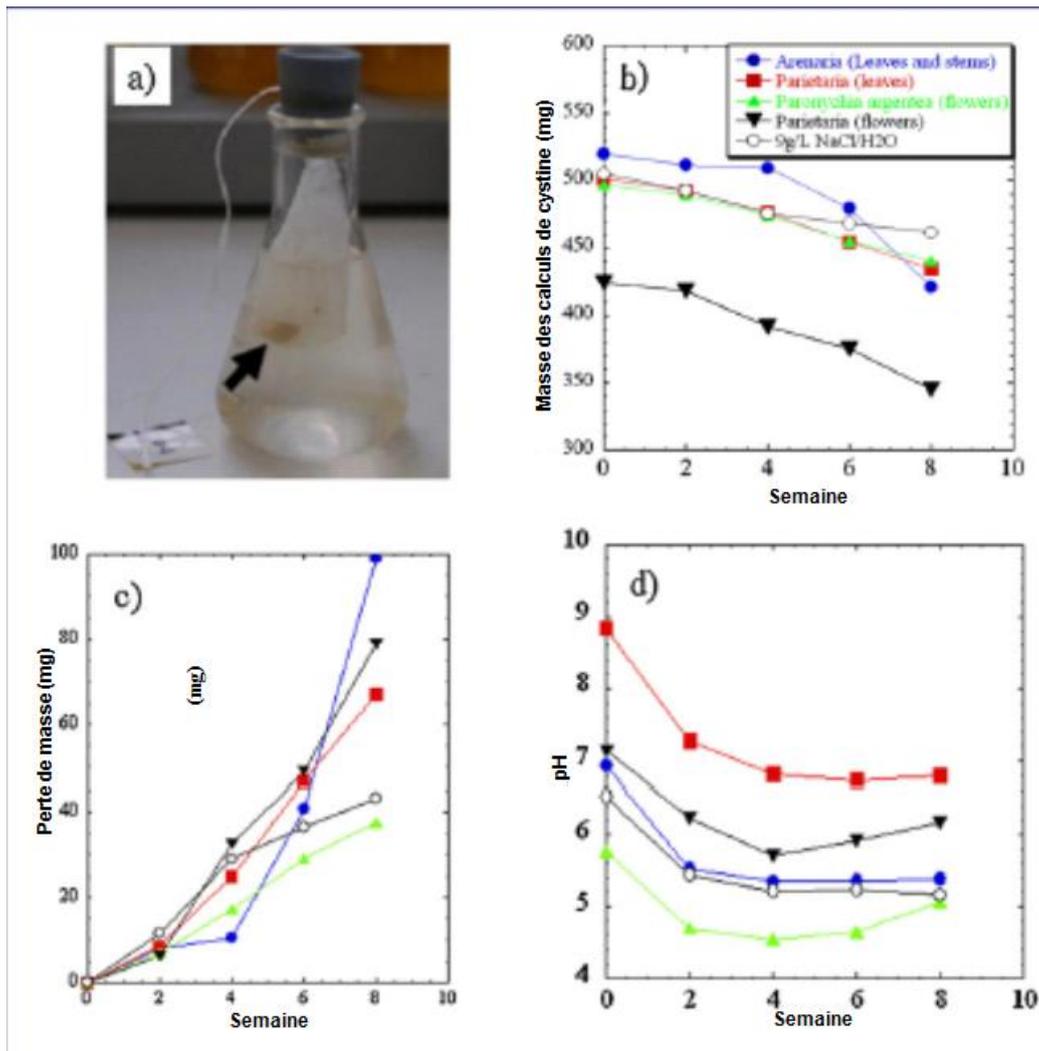
analyse par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Leur taille était de  $7 \pm 1$  mm et leur masse de  $472 \pm 52$  mg.

Nous avons ainsi sélectionné deux autres séries de quinze échantillons pour ces calculs composés de Brushite et d'oxalate de calcium type Id provenant de l'hôpital Necker-enfants malades à Paris. Il s'agit d'un mélange de calculs entiers et fragments de Brushite de masse  $m_b$  ( $61,4 \text{ mg} < m_b < 511,9 \text{ mg}$ ) et de calculs entiers d'oxalate de calcium type Id de masse  $m_d$  ( $323,9 \text{ mg} < m_d < 725,7 \text{ mg}$ ).

## V.2 Résultats

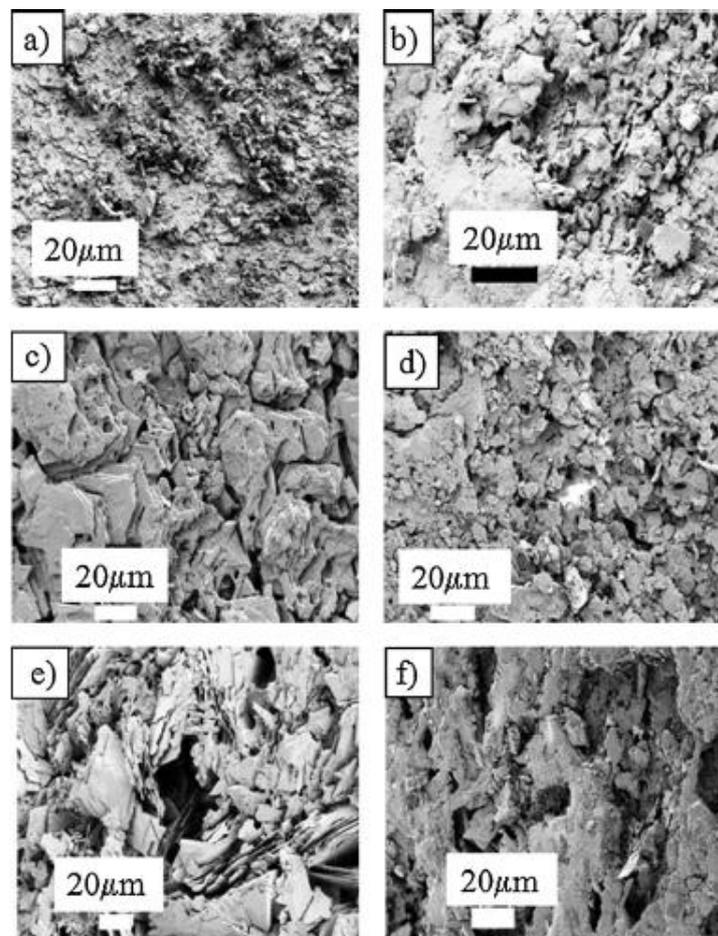
La perte moyenne de masse des calculs de cystine pour l'ensemble des expériences a été de  $64 \pm 39$  mg au bout de huit semaines. Les changements de masse des calculs de cystine pendant l'incubation avec chaque extrait ou la solution témoin sont présentés sur la Fig. 1b. Les cinétiques de dissolution semblent être différentes selon l'extrait de plante. Durant les deux premières semaines, la masse des calculs a peu varié. Entre deux et quatre semaines, le taux de dissolution est resté faible et a commencé à augmenter entre quatre et six semaines, en particulier pour *Arenaria ammophila* et les fleurs de *P. officinalis*.

Les résultats se sont confirmés après huit semaines, ces deux extraits de plantes montrant un effet sur la dissolution des calculs plus marqué que les autres, exprimé par une perte de masse importante par rapport aux autres extraits et surtout à la solution de NaCl. Toutefois, cette perte de masse (19,1 % vs 8,7 % pour la solution témoin) n'a pas atteint le seuil de significativité ( $p = 0,051$ ) sur la période de huit semaines fixée pour l'expérience. Sur la Fig. 1c, est rapportée la perte moyenne de masse des calculs selon l'extrait. On peut constater que la perte de masse était de 99 mg à la fin de l'expérience (huit semaines) pour l'extrait d'*Arenaria* ( $p = 0,051$ ) et de 80 mg pour les fleurs de *P. officinalis* ( $p = 0,11$ ) versus 44 mg pour la solution de NaCl. En ce qui concerne le pH du milieu (Fig. 1d), la valeur initiale variait de 5,8 pour *P. Argentea* à 8,8 pour les feuilles de *P. Officinalis* ( $p < 0,001$ ). Nous avons observé une diminution initiale du pH pendant les quatre premières semaines de l'expérience pour tous les extraits de plantes ainsi que pour la solution témoin.



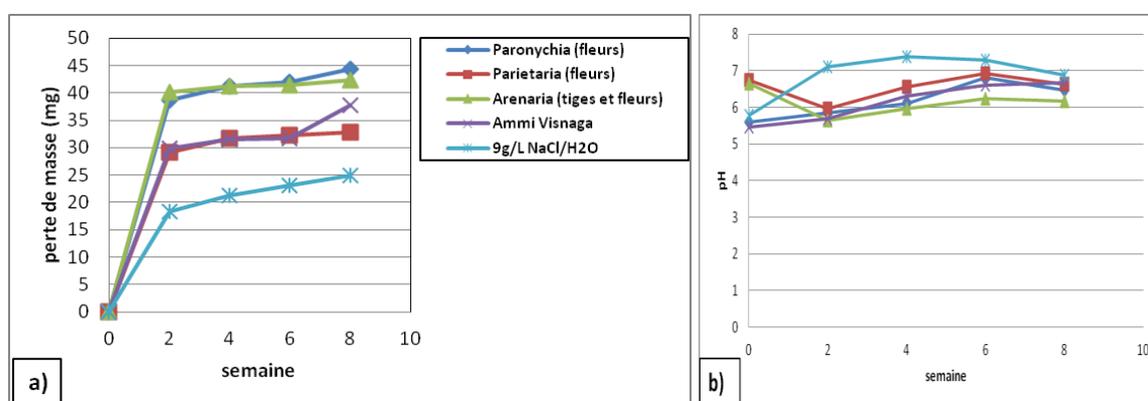
**Figure 1.** a : fiole contenant le calcul inséré dans un sachet immergé ; b : évolution de la masse des calculs de cystine (cercles bleus pour *Arenaria* (feuilles et tiges), triangles verts pour *Paronychia* (fleurs), carrés rouges pour *Parietaria* (feuilles), triangles noirs pour *Parietaria* (fleurs), cercles blancs pour la solution aqueuse de NaCl 9 g/L) ; c : perte de masse des calculs de cystine (légendes identiques à celles de la Fig. 1b) ; d : évolution du pH durant l'expérience (légendes identiques à celles de la Fig. 1b).

Les Fig. 2a et b montrent les images MEB des cristallites de cystine respectivement avant et au stade final dans le cas de la solution aqueuse de NaCl 9 g/L comparées à celles des calculs de cystine en contact avec l'extrait d'*Arenaria* (Fig. 2c). Bien que des différences semblent exister à l'échelle mésoscopique entre les surfaces des calculs soumis à l'action des extraits de plantes par rapport à celle observée avant traitement, il est difficile de les quantifier. Le traitement paraît avoir dissout en partie les petits cristaux de cystine, ne laissant bien visibles que les plus gros d'entre eux, séparés par des espaces vides plus ou moins larges. L'extrait de *P. officinalis* (Fig. 2e) exerçait un effet similaire à celui d'*Arenaria*, l'organisation des cristaux apparaissant feuilletée en raison, d'une orientation différente (Fig. 2c). En revanche, l'extrait de *Paronychia argentea* semble avoir eu peu d'effets sur la structure des calculs (Fig. 2d).



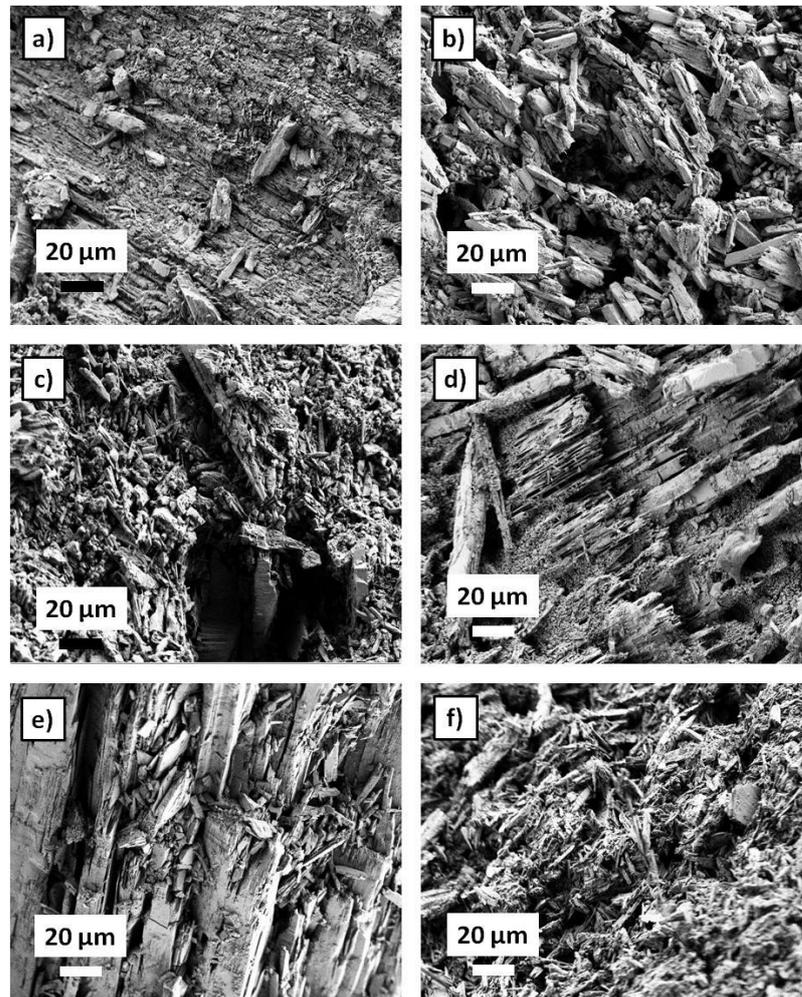
**Figure 2.** Surface des cristaux visualisés par MEB : a : avant tout traitement ; b : après traitement par la solution aqueuse de NaCl 9 g/L ; c : après traitement par la solution contenant *Arenaria ammophila* ; d : après traitement par la solution contenant *Paronychia argentea* ; e : après traitement par la solution contenant *Parietaria officinalis* (fleurs) ; f : après traitement par la solution contenant *P. officinalis* (feuilles).

Concernant les calculs de brushite, nous avons remplacé l'extrait de *Parietaria* (feuilles) par l'extrait d'*Ammi visnaga*. La perte de masse n'était pas considérable (perte de masse maximale n'excédant pas 10% (extrait de *Paronychia*)). La cinétique de la dissolution est présentée sur la Fig. 3a où on remarque que le processus de dissolution a commencé dès les premiers jours de l'expérience pour atteindre un maximum au bout de deux semaines. La perte de masse était quasiment nulle après la deuxième semaine pour les extraits de *Parietaria* et *Arenaria* et était dans les environs de 5 à 6 mg pour les autres extraits et la solution témoin pendant toutes les six dernières semaines. Nous avons ainsi remarqué que le processus de dissolution a repris durant les deux dernières semaines après avoir stagné dans l'intervalle deux à six semaines et ce seulement pour l'extrait de *Ammi visnaga*. En ce qui concerne le pH du milieu (Fig. 3b), la valeur initiale variait de 5,45 pour *Ammi visnaga* à 6,74 pour les fleurs de *P. Officinalis*. Pendant la durée de l'expérience le pH a connu plusieurs changements pour les différents extraits de plantes.



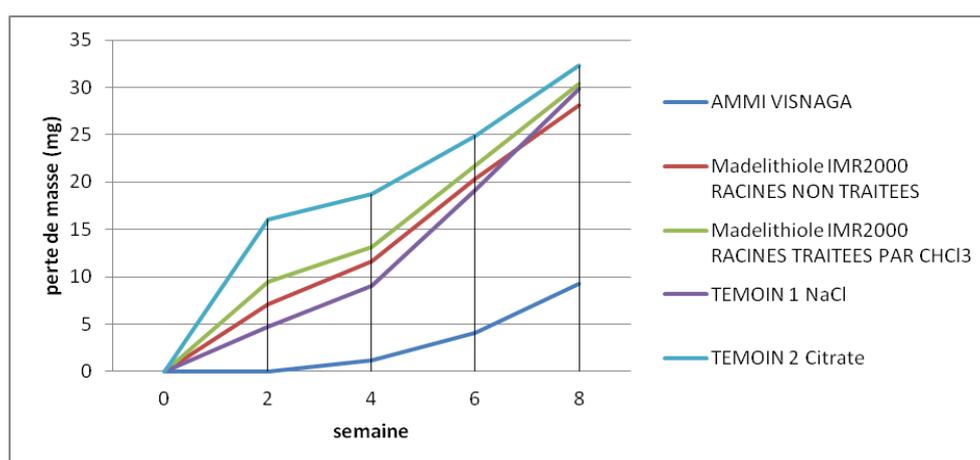
**Figure 3.** a : Perte de masse des calculs de Brushite (losanges bleues pour *Paronychia* (fleurs), carrés rouges pour *Parietaria* (fleurs), triangles verts pour *Arenaria* (fleurs et tiges), étoiles violettes pour *Ammi visnaga*, étoiles bleues pour la solution aqueuse de NaCl 9 g/L) ; b : évolution du pH durant l'expérience (légendes identiques à celles de la Fig. 1a).

La Fig. 4 montre l'état de surface des calculs de brushite observé sous MEB. La Fig. 4a montre l'état des cristallites avant le traitement comparé avec celui des calculs de brushite en contact avec les extraits de plantes et la solution témoin. Les dégradations observées au stade final sont les mêmes observées au cours de l'expérience où on remarque que les cristallites de brushite en forme de baguettes et aiguilles qui sont bien compactes ne le sont plus après le traitement avec les extraits des plantes avec apparition des espaces vides.



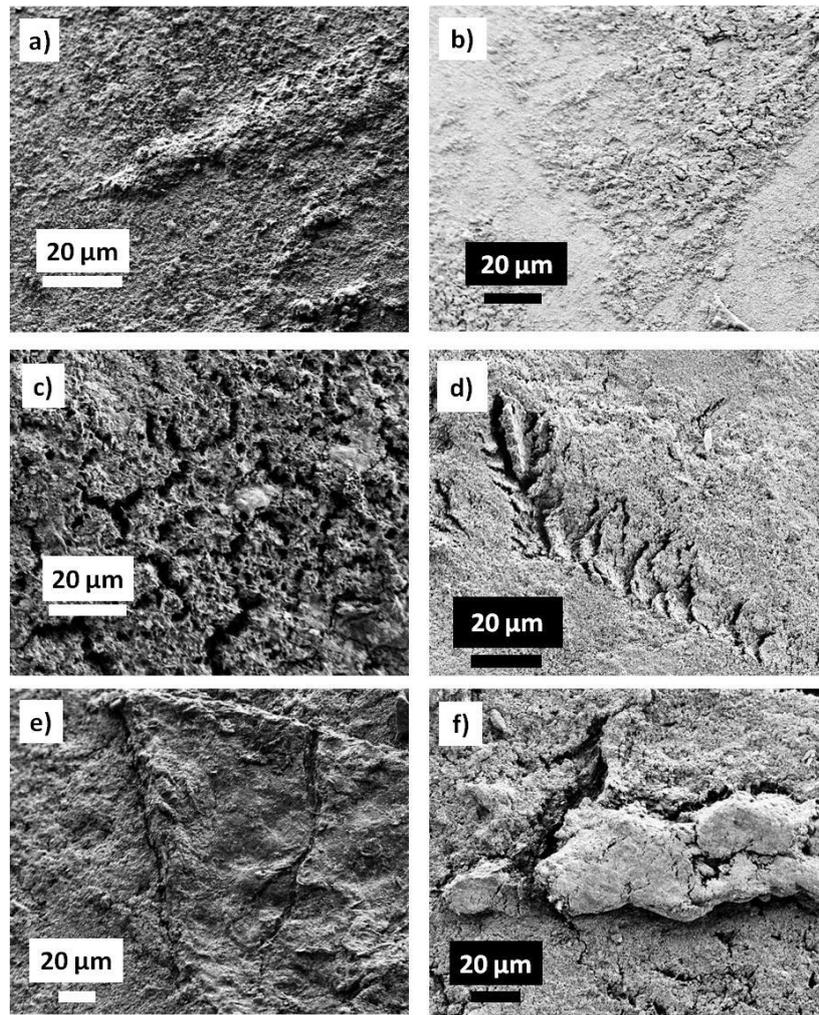
**Figure 4.** Surface des cristaux visualisés par MEB: a) avant tout traitement ; b) après traitement par la solution contenant *Paronychia argentea* ; c) après traitement par la solution contenant *Arenaria ammophila*; d) après traitement par la solution contenant *Ammi Visnaga*; e) après traitement par la solution contenant *Parietaria officinalis* ; f) après traitement par la solution aqueuse de NaCl 9g/L

Par rapport aux calculs d'oxalate de calcium type Id, nous avons réalisé l'expérience avec d'autres extraits de plantes, il s'agit cette fois des plantes suivantes : *Ammi visnaga*, racines non traitées de *Madélithiol IMR 2000*, et racines traitées par  $\text{CHCl}_3$  de *Madélithiol IMR 2000*. Nous avons considéré deux solutions aqueuses comme témoins (NaCl et citrate). La Fig. 5 montre les pertes de masse des calculs d'oxalate de calcium type Id dues à leur contact avec les extraits des plantes et les solutions témoins. Le processus de dissolution était très lent et continu avec une vitesse quasiment constante. La perte de masse la plus importante était de 32 mg pour la solution témoin de citrate.



**Figure 5.** Perte de masse des calculs d'oxalate de calcium type Id

Les images MEB obtenues ne montrent pas une claire dégradation de l'état de surface (Fig. 6). Quelques craquelures sont observées sur la surface des calculs d'oxalate de calcium type Id en contact avec la solution du citrate et l'extrait de *Madélithiol IMR2000* (racines non traitées) (Fig. 6c et Fig. 6f).



**Figure 6.** Surface des cristaux visualisés par MEB: a) avant tout traitement ; b) après traitement par la solution contenant *Ammi Visnaga* ; c) après traitement par la solution contenant Madélithiol IMR 2000 (racines non traitées) ; d) après traitement par la solution contenant Madélithiol IMR 2000 (racines traitées par  $\text{CHCl}_3$ ) ; e) après traitement par la solution aqueuse de NaCl 9g/L; f) après traitement par la solution aqueuse de citrate.

### V.3 Discussion

L'analyse de la littérature moderne montre que la médecine basée sur les plantes est en pleine expansion [42-45] celles-ci s'avérant apte à soigner un vaste spectre de pathologies comme le cancer [46], épilepsie [47], l'hypertension [48], diabète [49], Maladie de Parkinson [50] ou encore les infections [51]. Néanmoins, il convient de souligner d'une part que certaines études scientifiques ne confortent pas certaines pratiques médicales ancestrales [52] et d'autre part que l'utilisation des plantes dans le domaine médical n'est pas sans risque. En effet, plusieurs travaux soulignent la toxicité rénale de certaines plantes [53,54].

En ce qui concerne cette étude, les plantes sélectionnées pour notre étude n'ont pas été choisies aléatoirement. Elles sont utilisées actuellement en Algérie pour le traitement médical

des calculs rénaux ou pour prévenir leur formation. Bien qu'en Algérie comme dans tous les autres pays, l'oxalate de calcium soit la forme cristalline la plus courante, nous avons choisi les calculs de cystine parce que ce type de calcul est souvent plus difficile à traiter et à prévenir par les procédures urologiques et médicales actuellement disponibles. De plus, il a été montré récemment que des plantes utilisées en médecine traditionnelle au Maroc contre les calculs en général étaient capables de dissoudre efficacement *in vitro* les calculs de cystine [7].

Nous avons donc étudié *in vitro* l'effet de quatre extraits de plantes sur la dissolution de calculs rénaux de cystine bien caractéristiques et nous avons choisi le MEB à effet de champ pour suivre les changements éventuels dans la morphologie des cristallites permettant d'affirmer l'existence d'interactions entre les extraits de plantes et les calculs. De nombreuses études basées sur les observations MEB des calculs rénaux [55,56] ont largement démontré que cette technique était bien adaptée à cette problématique. Avec un microscope moderne comme le FEI-Zeiss, il est possible d'observer les détails de la surface des cristallites sans avoir à recouvrir l'échantillon avec une couche conductible de carbone, ce qui permet de répéter les observations au cours de l'expérience sans modifier la surface des prélèvements par un traitement qui pourrait gêner l'action ultérieure des extraits de plante testés.

Nos résultats n'ont pas permis de voir une différence significative entre les extraits et la solution témoin en ce qui concerne la perte de masse des calculs de cystine sur la période expérimentale choisie. Cependant, l'examen de la Fig. 1c montre que la pente de la courbe de dissolution obtenue pour l'extrait d'*A. ammophila* s'accroissait fortement dans les dernières semaines par rapport aux courbes observées avec les autres extraits, suggérant que cette plante est probablement plus efficace que les autres pour dissoudre les calculs de cystine, mais demande sans doute plus de temps que les plantes testées dans l'étude marocaine précédemment publiée. A l'échelle mésoscopique, des changements à la surface des calculs rénaux ont été observés dès le premier examen, c'est-à-dire au bout de deux semaines d'expérimentation (données non montrées), mais ne sont devenus perceptibles, en terme de perte de masse cristalline, qu'après quatre à six semaines de contact avec les extraits ou la solution de contrôle. Notre protocole expérimental était un peu différent de celui décrit pour l'étude des plantes marocaines en ce sens que les calculs ont été enfermés dans un sachet poreux en fibres tressées pour éviter le contact avec le barreau magnétique.

Ce protocole a été choisi pour éviter une dissociation des cristaux de cystine à la surface des calculs par un effet mécanique et non par le seul effet chimique de la solution testée. Cette différence pourrait être à l'origine de l'efficacité retardée des extraits de plantes

testés. Pour le vérifier, une nouvelle expérience sera réalisée, comparant les effets des plantes testées dans l'étude marocaine, en particulier *Zea Mays* et *Ammi Visnaga*, et de celles examinées dans le présent travail, notamment *A. Ammophila* et les fleurs de *P. Officinalis*. En ce qui concerne le pH du milieu, la valeur initiale apparaît très différente selon les extraits, comprise entre 5,8 pour *P. Argentea* et 8,8 pour les feuilles de *P. Officinalis* ( $p < 0,001$ ). La valeur élevée du pH suggère un effet d'alcalinisation sur la dissolution des calculs de cystine pour certains extraits. Cependant, si on compare la courbe de pH obtenue avec la solution saline à celle obtenue avec les extraits d'*A. Ammophila* ou des fleurs de *P. Officinalis*, on constate que les courbes sont très voisines, suggérant que les effets des extraits de plante sur la perte de masse des calculs ne sont pas liés au pH mais à la composition chimique de l'extrait de plante.

#### **V.4 Conclusion préliminaire**

L'effet de plusieurs plantes médicinales utilisées dans le traitement des calculs en médecine traditionnelle a été étudié *in vitro* à l'échelle mésoscopique par microscopie électronique à balayage. Les changements dans les caractéristiques ultrastructurales des calculs rénaux de cystine après traitement avec les plantes médicinales suggèrent que ces plantes exercent un effet sur les cristaux de cystine, mais l'évaluation des résultats par la perte de masse des calculs comparativement à une solution de référence de NaCl 9 g/L n'a pas permis de mettre en évidence un effet solvant significatif de ces extraits de plante sur la période expérimentale choisie. Au vu des courbes de perte de masse des calculs testés, ce manque de significativité s'explique probablement par une durée de contact insuffisante. De ce fait, malgré leur utilisation en médecine traditionnelle pour le traitement de la lithiase, on ne peut recommander, dans l'état actuel de nos connaissances, l'utilisation de ces plantes pour le traitement ou la prévention des calculs de cystine. Des essais complémentaires seront nécessaires pour objectiver un bénéfice scientifiquement démontré de certains des extraits testés sur la solubilisation de tels calculs.

Compte tenu des délais nécessaires pour observer un effet bénéfique *in vitro*, il paraît difficile de recommander ces plantes chez les patients cystinuriques pour dissoudre des calculs de cystine *in situ*. Cependant, ces plantes pourraient avoir un intérêt, qui reste à évaluer, pour la prévention des récurrences.

## Références

- [1] B. Hannache, D. Bazin, A. Boutefnouchet, M. Daudon, Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro : étude à l'échelle mésoscopique, *Progrès en urologie* 2012 ; 22 : 577 - 582.
- [2] M. Daudon, Cinq calculs - cinq photos - cinq diagnostics - cinq astuces, *Progrès en Urologie - FMC*, 2012 ; 22 : F87-F93.
- [3] A. Kamoun, A. Zghal, M. Daudon, S. Ben Ammar, L. Zerelli, J. Abdelmoula, B. Chaouachi, T. Houissa, C. Belkahia, R. Lakhoua, M. Daudon, La lithiase urinaire de l'enfant: contributions de l'anamnèse, de l'exploration biologique et de l'analyse physique des calculs au diagnostic étiologique, *Archives de Pédi.* 1997 ; 4 : 629 - 638.
- [4] S. Bouanani, C. HENCHIRI, E. Migianu-Griffoni et al., Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010 ; 129 : 38 - 45.
- [5] A. Frackowiak, T. Kozlecki, P. Skibinski et al. Solubility, inhibition of crystallization And microscopic analysis of calcium oxalate crystals in the presence of fractions from *Humulus lupulus L.* ; *J. Crystal Growth* 2010 ; 312 : 3525 - 3532.
- [6] J.P. Grunfeld, D. Joly, Maladies rénales héréditaires chez l'adulte. *Rev. Prat.* 1997 ; 47 : 1566-1599.
- [7] F. Meiouet, S. El Kabbaj, M. Daudon M. Étude in vitro de l'activité litholytique de quatre plantes médicinales vis-à-vis des calculs urinaires de cystine. *Prog Urol* 2011; 21 : 40-47.
- [8] P. Jungers, D. Joly, A. Blanchard, M. Courbebaisse, B. Knebelmann, M. Daudon, Lithiases rénales héréditaires monogéniques : récents acquis diagnostiques et thérapeutiques, *Néphrologie & Thérapeutique*, 2008 ; 4 : 231-255.
- [9] D. Chauveau, D. Vanderperren, L. Tricot, J.P. Grünfeld, P. Rémy, D. Rabier et al. Manifestations rénales des maladies héréditaires du métabolisme chez l'adulte. *Actual Nephrol* 2004 ; 34 : 119-142.
- [10] M.C. Gubler, C. Antignac, Néphropathies héréditaires : de la lésion au gène. *Actual. Nephrol.* 2003 ; 33 : 233-248.
- [11] M. Labeeuw, C. Gerbaulet, N. Pozet, P. Zech, J. Traeger, Cystine crystalluria and urinary saturation in cystine and non-cystine stone formers, *Urological Research* 1981 ; 9 : 163-168.
- [12] M.J. Calonge, P. Gasparini, J. Chillarón et al. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat. Genet.* 1994 ; 6 : 420 - 425.
- [13] E. Pras, N. Arber, I. Aksentijevich, et al. Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nat Genet* 1994 ; 6 : 415 - 419.
- [14] Å. Lindell, T. Denneberg, E. Hellgren, J. -O. Jeppsson, H. -G. Tiselius, Clinical course and cystine stone formation during tiopronin treatment, *Urol. Res.* 1995 ; 23 : 111-117.
- [15] S. Segal, Cystinuria. In: Scriver CR, Beaudet AZ, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of Inherited disease.* 7e édition, New York: McGraw-Hill; 1995 pp 3581 - 3601.
- [16] A. Lindell, T. Denneberg, G. Granerus, Studies on renal function in patients with cystinuria. *Nephron* 1997 ; 77 : 76 - 85.
- [17] F. Barbey, D. Joly, P. Rieu, N. N'Guessau, M. Daudon, P. Jungers, Traitement médical de la cystinurie : évaluation des résultats à long terme chez 30 patients. *Presse Med.* 2000 ; 29 : 528 - 532.
- [18] F. Barbey, D. Joly, P. Rieu et al. Medical treatment of cystinuria: Critical reappraisal of long-term results, *J. Urol.* 2000 ; 163 : 1419 - 1423.
- [19] D.G. Assimios, S.W. Leslie, C. Ng, S.B. Strem, L.J. Hart, The impact of cystinuria on renal function. *J Urol* 2002 ; 168 : 27-30.
- [20] L. Dello Strologo, E. Pras, C. Pontesilli et al. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 2547-2553.
- [21] M. Gürdal, A. Ayyıldız, E. Huri, H. Kanberoğlu, M. İhsan Karaman, A huge bladder cystine stone, *Int. Urology and Nephrology* 2003 ; 35 : 497-499.
- [22] R. S Purohit, M.L Stoller, Laterality of symptomatic cystine calculi, *Urology*, 2003 ; 62, 421-424.
- [23] P.K. Pietrow, B.K. Auge, A.Z. Weizer et al. Durability of the medical management of Cystinuria, *J Urol* 2003 ; 169 : 68-70.
- [24] M. Daudon, F. Cohen-Solal, F. Barbey, M.F. Gagnadoux, B. Knebelmann, P. Jungers, Cystine crystal volume, Determination : a useful tool in the management of cystinuric patients. *Urol Res* 2003 ; 31 : 207-211.
- [25] E. Brauers, U. Vester, K. Zerres, T. Eggermann, Search for mutations in SLC1A5 (19q13) in cystinuria patients, *J. of Inherited Metabolic Disease* 2005 ; 28 : 1169-1171.
- [26] M. Boutros, C. Vicanek, R. Rozen, P. Goodyer, Transient neonatal cystinuria. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 443-448.
- [27] E.M. Worcester, J.H. Parks ? A.P. Evan AP, et al. Renal function in patients with

- nephrolithiasis. *J Urol* 2006 ; 176 : 600 - 603.
- [28] K. Martens, I. Heulens, S. Meulemans et al. Global distribution of the most prevalent deletions causing hypotonia- cystinuria syndrome. *Eur J Hum Genet* 2007 ; 15(10) : 1029 - 1033.
- [29] H. Bouzidi, M. Daudon, Cystinurie : du diagnostic à la surveillance thérapeutique. *Ann. Biol. Clin.* 2007 ; 65 : 473 - 481.
- [30] P. Buisson, E. Haraux, M. Hamzy, J. Ricard, J.-P. Canarelli, B. Boudailliez, K. Braun, Cystinurie chez l'enfant : à propos de 4 observations, *Archives de Pédiatrie* 2011 ; 18 : 553 - 557.
- [31] E. Letavernier, O. Traxer, J.P. Haymann, D. Bazin, M. Daudon, Cystinurie, *Progres en urologie – FMC* 2012 ; 22 : F119 – F123.
- [32] T. Eggerman, A. Venghaus, K. Zerres, Cystinuria : an inborn cause of urolithiasis, *Orphanet J. of Rare Diseases* 2012, 7 : 19 - 30.
- [33] R. Hautmann, Cystine-stone therapy with alpha-mercapto-propionylglycine, *World J. of Urology* 1983 ; 1 : 186 - 191
- [34] G. Egghart, H. -D. Marquardt, H. B. Kastert, F. Feizelmeier, Percutaneous nephrostomy and irrigation lithochemolysis a new concept for the treatment of cystine stones, *International Urology and Nephrology* 1983 ; 15 : 131 – 136.
- [35] G. Katz, A. Shapiro, Z. Lencovsky, M. Caine, D. Pore, Place of extracorporeal shock-wave lithotripsy (ESWL) in management of cystine calculi. *Urology* 1990 ; 36, 124-128.
- [36] D.H. Adams, B.B. Abernathy, Laser ureterolithotripsy for cystine calculi. *AORN* 1996 ; 64 : 924-930.
- [37] E. H. Landau, O.Z. Shenfeld, D. Pode et al., Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy in Prepubertal Children : 22-Year Experience at a single institution with a single lithotripter, *The Journal of Urology*, 2009 ; 182 : 1835-1840.
- [38] A. Erozcenci, Percutaneous Nephrolithotomy in Children with Cystine Stone: Long- Term Outcomes from a Single Institution, *The Journal of Urology*, 2013 ; 190 : 234-238.
- [39] V. Estrade, K. Bensalah, J.-P. Bringer, E. Chabannes, X. Carpentier, P. Conort, E. Denis, B. Doré, J.R. Gautier, H. Hadjadj, J. Hubet, A. Hoznek, E. Lechevallier, P. Meria, P. Mozer, C. Saussine, L. Yonneau, O. Traxer, Comité lithiase de l'AFU, Place de l'urétéroréno-scopie souple en première intention pour le traitement des calculs du rein. Résultats de l'enquête de pratique du comité lithiase de l'AFU réalisée en 2011, *Progrès en Urologie*, 2013 ; 23 : 22-28.
- [40] A. Tekin, S. Tekgul, N.A. Atsu et al. Cystine calculi in children: the results of a metabolic evaluation and response to medical therapy. *J Urol* 2001 ; 165 : 2328-2330.
- [41] P. Parvex, R. Rozen, A. Dziarmaga, P. Goodyer, Studies of urinary cystine precipitation in vitro: ontogeny of cysteine Nephrolithiasis and identification of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid as a potential therapy for cystinuria. *Mol Genet Metab* 2003 ; 80 : 419-425.
- [42] Ş. Kültür, Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey), *J. of Ethnopharm.* 2007 ; 111, 341-364.
- [43] M.J. Macía, E. García, P. J. Vidaurre, An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia, *J. of Ethnopharmacology* 2005 ; 97 : 337-350.
- [44] B. Ballabh, O.P. Chaurasia, Z. Ahmed, S. Bala Singh, Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh- Used against kidney and urinary disorders, *J. of Ethnopharmacol.* 2008 ; 118 : 331 - 339.
- [45] A. Lengani, L. Fulbert Lompo, I. P. Guissou, J. B. Nikiema, Médecine traditionnelle et maladies des reins au Burkina Faso, *Néphrologie & Thérapeutique*, 2010 ; 6 : 35 - 39.
- [46] W. R. Sawadogo, M. Schumacher, M.-H. Teiten, M. Dicato, M. Diederich, Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy review article, *Biochemical Pharmacol.* 2012 ; 84, 1225 - 1240.
- [47] C. Marchetti, P. Gavazzo, G. I. Stafford, J. Van Staden, South African plants used in traditional medicine to treat epilepsy have an antagonistic effect on NMDA receptor currents, *J. of Ethnopharmacology*, 2011 ; 137 : 382 - 388.
- [48] R.L. Cai, M. Li, S.H. Xie, Y. Song, Z.M. Zou, C.Y. Zhu, Y. Qi, Antihypertensive effect of total flavone extracts From *Puerariae Radix*, *J.of Ethnopharmacol.* 2011 ; 133 : 177 - 183.
- [49] C. Gumy, C. Thurnbichler, E. M. Aubry, Z. Balazs, P. Pfisterer, L. Baumgartner, H. Stuppner, A. Odermatt, J. M. Rollinger, Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by plant extracts used as traditional antidiabetic medicines, *Fitoterapia*, 2009 ; 80 : 200-205.
- [50] Y.H. Wang, V. Samoylenko, B. L. Tekwani, I. A. Khan, L. S. Miller, N. D. Chaurasiya, M. Rahman, L. M. Tripathi, S. I. Khan, V. C. Joshi, F. T. Wigger, I. Muhammad, Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease, *J. of Ethnopharmacology*, 2010 ; 128 : 662 - 671.
- [51] H. De Wet, V.N. Nzama, S.F. Van Vuuren, Medicinal plants used for the treatment of sexually transmitted infections by lay people in northern Maputaland, KwaZulu–Natal Province, South Africa? *South African J. of Botany* 2012; 78 : 12 - 20.

- [52] N.W. Vogel, A.P.D. Taschetto, R. Dall'Agnol, L. Weidlich, E.M. Ethur, Assessment of the antimicrobial effect of three plants used for therapy of community-acquired urinary tract infection in Rio Grande do Sul (Brazil). *J. of Ethnopharmacology* 2011 ; 37 : 1334 - 1336.
- [53] C.R.D. Colson, M. E. De Broe, Kidney injury from alternative medicines *Advances in Chronic Kidney Disease* 2005 ; 12 : 261 - 275.
- [54] V. Jha, M. Rathi, Natural Medicines Causing Acute Kidney Injury, *Seminars in Nephrology* 2008 ; 28 : 416 - 428.
- [55] E.A. Abdel-Aal, S. Daosukho, H. El-Shall, Effect of supersaturation ratio and Khella extract on nucleation and morphology of kidney stones. *J. Crystal Growth* 2009 ; 311 : 2673 - 2681.
- [56] H.H Dorian, P. Rez, G.W. Drach, Evidence for aggregation in oxalate stone formation: atomic force and low voltage scanning electron microscopy. *J. Urol.* 1996 ; 156 : 1833 - 1850.

## Chapitre VI : Discussion

Différents articles soulignent l'ubiquité des calcifications pathologiques [1,2] dans le corps humain, leur caractère bénin ou malin ainsi que le large spectre de pathologies associées avec parmi elles le cancer, les maladies infectieuses, les maladies environnementales et génétiques évoquées précédemment. Bien que la littérature sur le sujet soit vaste (de nombreux journaux lui sont dédiés cf. par exemple [3]) et ce en raison des différents problèmes de santé majeurs abordés, une analyse rapide de la bibliographie montre que cette recherche dédiée aux calcifications pathologiques est des plus dynamiques. Cette recherche rend compte ainsi non seulement des enjeux de société mais aussi de la complexité de ce sujet de recherche dans la mesure où de multiples facteurs cellulaires (maladie génétique), bactériens (infections), environnementaux (toxicité de certains éléments ou de certaines molécules) ou une modulation de l'alimentation (simple déshydratation, alimentation trop riche en protéines) sont susceptibles d'enclencher la formation de dépôts minéraux anormaux, calciques ou non, dans un tissu, un organe ou sur un dispositif médical.

Parmi ces calcifications pathologiques, concrétions et calcifications ectopiques incluses et en considérant tous les organes, les concrétions rénales ou calculs rénaux constituent la classe de calcifications pour laquelle la compréhension des processus biochimiques responsables de leur pathogenèse et leur lien à la pathologie sont les plus aboutis. La classification des calculs basée sur leur morphologie à l'échelle macroscopique et leur composition chimique effectuée par spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier proposée trois décennies plus tôt est désormais à la base de la pose d'un diagnostic médical [4]. Elle constitue donc l'un des changements profonds de la pratique médicale en urologie et en néphrologie au côté de la mise en œuvre de la lithotripsie ou encore de l'urétéroscopie. De nos jours, l'absence d'une analyse précise du calcul constitue donc une aberration qui peut avoir des conséquences graves sur le plan clinique.

Au cœur de cette nouvelle approche, le patient bénéficie donc désormais sur la base de ces résultats de physicochimie de la pose d'un diagnostic adéquat et donc d'une meilleure prise en charge. Plus précisément, pour les patients qui présentent une dégradation significative de la fonction rénale, ces mesures de physicochimie ont permis de la stabiliser, leur évitant ainsi la dialyse et donc la greffe. Deux conséquences majeures sont donc associées à ces mesures de physicochimie, une amélioration sans ambiguïté du mode de vie de certains patients et une économie financière conséquente réalisée par la société puisque plusieurs ordres de grandeur séparent le coût d'une telle mesure de physicochimie (estimée à

une centaine d'euros) du coût d'une dialyse (65000 euros/an) et d'une greffe rénale (65000 euros/an sans compter le surcoût engendré par le traitement médical lié au rejet possible de la greffe). D'autre part, le clinicien dispose d'outils d'investigations qui sont désormais présents au sein de l'hôpital puisque dans le service des explorations fonctionnelles de l'hôpital Tenon sera implanté un imageur infra rouge de dernière génération capable de collecter plus de 100000 spectres infra rouge en une dizaine de minutes. L'étude physicochimique de biopsies rénales (ou d'autres tissus) peut donc s'intégrer pleinement dans le processus classique des analyses effectuées en routine à l'hôpital.

Cet accomplissement majeur a été rendu possible en substituant aux techniques d'analyse chimique permettant uniquement la connaissance de la composition ionique des calculs rénaux des techniques de physicochimie bien plus instructives. Ceux-ci contiennent en effet à la fois une partie minérale et une partie organique et possèdent une structure ordonnée à différentes échelles (de l'échelle macroscopique à l'échelle nanométrique). Si le nombre d'éléments chimiques est faible (Ca, P, C, O, N, H), le nombre de composés (cristallisés et amorphes) est élevé puisque plus d'une centaine de composés a été identifié au niveau des calculs.

Ces techniques de physicochimie de laboratoire et notamment la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier ont joué un rôle de premier plan dans la réalisation de ces avancées scientifiques majeures. En fait, si l'on intègre les connaissances cliniques et physicochimiques inhérentes à la lithiase, parmi toutes les techniques de physicochimie, seule la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier s'avère apte à mettre en évidence des composés amorphes, à évaluer le taux de carbonatation d'une apatite ou encore à différencier les différents phosphate de calcium.

La recherche exposée dans ce manuscrit s'inscrit dans cette démarche globale en abordant différents aspects de physicochimie associés à la lithiase. Grâce à ces techniques, nous avons apporté quelques éléments de réponse concernant l'épidémiologie actuelle de la lithiase en Algérie et plus précisément dans l'est de l'Algérie, le rôle des éléments traces dans la genèse des calculs rénaux et l'évaluation des plantes médicinales.

En ce qui concerne l'épidémiologie, bien que le nombre de calculs de notre série soit faible, les résultats obtenus témoignent de ce qui est observé sur le plan socioéconomique, l'évolution de l'Algérie vers le niveau des pays industrialisés. Cette évolution sociétale se traduit par le changement de composition chimique des calculs rénaux et plus précisément par l'observation de l'oxalate de calcium sous la forme de whewellite comme phase chimique prépondérante. Désormais, près de 50% des calculs sont formés majoritairement de

whewellite (50,7% en France contre 50,3 % pour l'Ouest Algérien et 49,4% pour l'Est Algérien). Néanmoins, le nombre de calculs d'origine infectieuse semble encore relativement élevé et l'accès au soin est, comme dans les pays industrialisés suite à la dépression économique qui sévit actuellement, un problème qui reste d'actualité. De ce point de vue, la présence toujours élevée d'urate d'ammonium à la fois au niveau des calculs (24,6% pour l'Est Algérien versus 4.8% en France) et des noyaux (Chez la femme 17.3% dans l'Est Algérien versus 2.9% dans l'Ouest Algérien et 0.8% en France) témoignent de contextes infectieux digestifs ou urinaires encore fréquemment à l'origine des calculs même si la lithiase vésicale endémique de l'enfant semble en régression comme dans tous les pays. Rappelons que seulement 54 % des calculs associés à une infection clinique contiennent de la struvite [5-12]. Dans 23% des cas, on trouve un mélange de phosphates de calcium sans struvite mais avec une teneur en protéines supérieure à 5 %, et dans 5 % des cas le calcul est composé d'urate d'ammonium. Enfin dans 3% une matrice protéique représente la principale composante du calcul.

Par ailleurs, on note une proportion de lithiase urique plus élevée que dans la série publiée en 2006 dans l'ouest Algérien (12.9% pour l'Est Algérien contre 7.3 pour l'Ouest Algérien  $p < 0.05$ ). Or, depuis plus d'une décennie, on assiste à une progression dramatique de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète de type II, la prévalence de ce dernier dépassant 10% de la population algérienne aujourd'hui (Cette prévalence globale est de 15,3 % en milieu urbain et de 12,9 % en milieu rural) [13]. Par comparaison, on dénombre en France environ 3,5 % de diabétiques (soit 1 600 000 diabétiques connus et 400 000 diabétiques qui s'ignorent). Le lien entre le diabète de type II et la lithiase urique a été clairement démontré dans plusieurs études [14-16] et pourrait expliquer l'augmentation de la proportion de lithiase urique dans notre cohorte par rapport à celle de l'Ouest Algérien publiée il y a plus de 10 ans.

Le rapport H/F égal à 1.85 pour un rapport égal à 2.1 en France est dans la moyenne des chiffres de la littérature. L'évolution de ce rapport H/F en fonction de l'âge montre que le sujet masculin est plus exposé à la lithiase aux extrémités de la vie. On retrouve ainsi l'explication donnée précédemment pour l'augmentation de la lithiase urique avec l'âge en raison de l'accroissement de la prévalence du syndrome métabolique et au diabète de type II, ce dernier affectant plus souvent les hommes que les femmes dans la population Algérienne [5].

Pour les éléments traces, les résultats sont cohérents avec des études antérieures [17-21] qui soulignent l'absence de processus catalytiques et envisagent une simple adsorption

d'éléments traces comme origine de leur présence dans les calculs rénaux. Les modulations des teneurs en Zn, en Sr ou en Pb en fonction de la nature des phases chimiques composant le calcul sont directement reliées aux propriétés physicochimiques de ces phases. Néanmoins, la différence entre la whewellite et la weddellite expliquée préalablement par une conversion cristalline reste à approfondir. En effet, dans ce cas la conversion cristalline est censé induire un relargage identique pour tous les éléments et les mesures contredisent cette hypothèse puisque les rapports  $Zn(C2)/Zn(C1)$ ,  $Sr(C2)/Sr(C1)$  et  $Pb(C2)/Pb(C1)$  sont très différents respectivement égaux à 6.7 , 19.7 et 2.4. Ces différences peuvent s'expliquer si l'on intègre le contexte biologique. Ainsi, pour le Sr, la whewellite (C1) est associée à une hyperoxalurie alors que la weddellite est associée à une hypercalciurie. Dans la mesure où le Sr suit les voies métaboliques du Ca, on s'attend à ce que la teneur en Sr de la weddellite soit supérieure à celle observée pour la whewellite ce qui est le cas. Pour le Zinc, le C2 est bien plus inflammatoire en raison de la morphologie particulière de ces cristaux qui présentent des arêtes tranchantes, cette inflammation induisant la présence de métalloprotéines riche en Zn. Quant au plomb, les teneurs sont très voisines et peu différentes de celles observées dans l'étude Française précédente. Le fait que le plomb soit un contaminant externe suggère un environnement lui-même très pauvre en plomb qui fait suite au remplacement des conduites de plomb du réseau d'adduction d'eau urbain par des canalisations en PVC.

Enfin, aucun des extraits de plantes utilisés en médecine traditionnelle contre la lithiase et testés *in vitro* n'a eu d'effet tangible pour dissoudre les calculs de cystine, de brushite ou d'oxalate de calcium (de type Id). Pour les calculs de cystine, le seul qui a semblé avoir un effet solvant non lié au pH était l'extrait d'*A. Ammophila*. Si ces résultats peuvent être en première approximation décevants sur le plan de la pharmacologie, ils sont en fait très importants dans la mesure où l'utilisation de plantes médicinales n'est pas sans danger.

## Références

- [1] E. Bonucci, *Biological Calcification : Normal and Pathological Processes in the Early Stages*, Ed. Springer, 2007, Berlin.
- [2] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, C. Rey, Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications, *Chem. Rev.* 2012 ; 112 : 5092 - 5120.
- [3] *Calcified Tissue International*, Ed. Springer.
- [4] M. Daudon, C.A. Bader, P. Jungers, Urinary calculi : review of classification methods and correlations with etiology, *Scan. Microsc.* 1993 ; 7 : 1081 - 1106.
- [5] B. Hess, Prophylaxis of infection-induced kidney stone formation, *Urological Research* 1990 : 18 : S45 - S48.
- [6] M. Daudon, L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant, *Arch. Pediatr.* 2000 ; 7 : 855 - 865.
- [7] K.-H. Bichler, E. Eipper, K. Naber, V. Braun, R. Zimmermann, S. Lahme , Urinary infection stones, *Int. J. of Antimicrobial Agents* 2002 ; 19 : 488 - 498.
- [8] P. Rieu, Lithiases d'infection, *Annales d'Urologie* 2005 ; 39 : 16 - 29.
- [9] F. Bruyere, O. Traxer, C. Saussine, E. Lechevallier, Infection et lithiase urinaire, *Prog. Urol.* 2008 ; 18 : 1015 - 1020.
- [10] A.E. Krambeck, J.C. Lieske, Infection-Related Kidney Stones, *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 2011 ; 9 : 218 - 228.
- [11] J. Colli, R. Thomas, infection stones, *Urolithiasis* 2012, pp 231 - 235.
- [12] K.M. Englert, J.A. McAteer, J.E. Lingeman, J.C. Williams Jr, High carbonate level of apatite in kidney stones implies infection, but is it predictive? *Urolithiasis in press.*
- [13] S. Zaoui, Ch. Biemont, K. Meguenni, Approche épidémiologique du diabète en milieu urbain et rural dans la région de Tlemcen (Ouest algérien) *Santé* 2007 ; 17 : 15 - 21.
- [14] M. Daudon, O. Traxer, P. Conort, B. Lacour, P. Jungers, Type 2 diabetes increases the risk for uric acid stones, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 ; 17 : 2026 - 2033.
- [15] M. A. Cameron, N. M. Maalouf, B. Adam-Huet, O.W. Moe, K. Sakhaee, Urine composition in type 2 diabetes: predisposition to uric acid nephrolithiasis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 ; 17 : 1422 - 1428.
- [16] M. Daudon, B. Lacour, P. Jungers, High prevalence of uric acid calculi in diabetic stone Formers, *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005 ; 20 : 468 - 469.
- [17] I. Durak, Z. Kilic, A. Sahin, M. Akpoyraz, Analysis of calcium, iron, copper and zinc contents of nucleus and crust parts of urinary calculi. *Urological Research* 1992 ; 20 : 23 - 26.
- [18] D. Bazin, P. Chevallier, G. Matzen, P. Junger, M. Daudon, Heavy elements in urinary Stones, *Urol Res* 2007 ; 35 : 179-184.
- [19] M. Slojewski, B. Czerny, K. Safranow, K. Jakubowska, M. Olszewska, A. Pawlik, Microelements in stones, urine, and hair of stone formers: A new key to the puzzle of lithogenesis? *Biological Trace Element Research* 2010 ; 137 : 301 - 316.
- [20] M. Slojewski, Major and trace elements in lithogenesis. *Central European J. of Urology* 2011 ; 64 : 58 - 61.
- [21] J. Kuta, J. Machat, D. Benova, R.C. Ervenka, J. Zeman, P. Martinec, Association of minor and trace elements with mineralogical constituents of urinary stones: A hard nut to crack in existing studies of urolithiasis, *Env. Geochem. Health* 2013 ; 35 : 511 - 522.

## Chapitre VII : Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse s'inscrivent dans le cadre de projets de recherche situés à l'interface entre la physique, la chimie, la biologie et la médecine. Ils s'attachent à décrire par des techniques de physicochimie les processus biochimiques responsables de la genèse de calcifications pathologiques et plus précisément de concrétions rénales. Les expériences ont donc été réalisées à la fois dans des laboratoires de physique et dans des services de l'assistance publique. Les problématiques, définies par la communauté médicale, sont associées à l'épidémiologie inhérente à cette pathologie, aux rôles des éléments traces dans la formation des calculs et à la pertinence de certaines plantes médicinales qui font partie de la pharmacopée utilisée en Algérie.

En vue d'aborder de manière la plus précise possible la lithiase en Algérie, une cohorte de 82 calculs a été considérée et a fait l'objet d'une classification morphoconstitutionnelle. Bien que le nombre de calculs soit faible, l'épidémiologie de la lithiase dans cette région de l'Algérie a été esquissée. Les premières analyses doivent cependant être confortées par la publication d'une étude portant sur un plus grand nombre d'échantillons. Les calculs d'oxalate de calcium deviennent prépondérants en raison d'un changement des habitudes alimentaires avec toutefois une persistance des calculs d'origine infectieuse que l'infection soit urinaire ou digestive.

Le deuxième volet de cette thèse aborde la présence des éléments traces dans les calculs puisque certains travaux montrent l'influence possible de certains cations comme le  $Zn^{2+}$  sur la vitesse de croissance de phases présentes dans les calculs rénaux. Des expériences de fluorescence X ont été effectuées afin de déterminer la nature et la teneur de ces éléments traces, ces informations permettant d'établir leur rôle catalytique possible. Les données acquises sur l'ensemble de la cohorte ne soulignent pas un tel processus catalytique mais sont en faveur d'un simple processus d'adsorption. Les règles de Goldschmitt qui régissent l'insertion d'éléments dans des matrices, les teneurs mesurées pour les différents cations ( $Zn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  et  $Pb^{2+}$ ) qui sont cohérentes avec celles mesurées dans l'organisme ou encore les propriétés physicochimiques des différentes phases chimiques identifiées au sein des calculs constituent un ensemble cohérent.

Enfin, le succès grandissant des plantes médicinales en général et leur mise en œuvre pour éviter les crises de coliques néphrétiques en particulier n'étant pas sans danger puisque dans certains cas, la fonction rénale peut être altérée, il nous a paru nécessaire de conforter ces pratiques médicales par des mesures de physicochimie. Aucun des extraits testés issus de la

pharmacopée algérienne (*Arenaria ammophila* (tiges et feuilles), les feuilles de *Parietaria Officinalis*, les fleurs de *Parietaria Officinalis*, les fleurs de *Paronychia Argentea*, *Ammi visnaga*, racines non traitées de *Madélithiol IMR 2000*, et racines traitées par  $\text{CHCl}_3$  de *Madélithiol IMR 2000*) n'a eu d'effet tangible pour dissoudre les calculs de cystine, de brushite ou d'oxalate de calcium (de type Id).

De nombreux travaux restent à effectuer sur ces différents points. Au niveau de l'épidémiologie, la fréquence des calculs d'origine infectieuse est certainement un paramètre qu'il convient de surveiller au travers d'une étude plus large. On sait que dans les pays industriels, ces calculs d'origine infectieuse témoignent d'un accès au soin rendu difficile en raison de la crise économique. L'importance des éléments traces reste d'actualité mais plutôt dans les tissus. Un nouvel axe de recherche possible est donc donné par des mesures de fluorescence X sur des tissus rénaux afin d'aborder différentes thématiques (cancer, maladies engendrées par des néphrotoxiques ...). Enfin la mise en œuvre de plantes médicinales reste un axe de recherche majeur qui devrait s'accomplir au travers de nouvelles collaborations notamment en pharmacologie.

## Liste des figures et des tableaux

### Chapitre I : Généralités et état de l'art

**Figure 1.** Evolution historique et géographique de la lithiase urinaire

**Figure 2.** Composition des calculs en fonction de l'âge, sur une série de 1354 calculs provenant des services d'urologie de l'Ouest Algérien.

**Figure 3.** Les étapes de la lithogénèse.

**Figure 4 :** Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines

### Chapitre II : Les techniques de caractérisation dans le contexte des calcifications pathologiques

**Figure 1.** Exemples de quelques types morphologiques de calculs de l'arbre urinaire.

**Figure 2.** Différents types de vibrations (élongations, déformations dans le plan, déformations hors du plan).

**Figure 3.** Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.

**Figure 4.** Différents spectres de calculs collectés à l'hôpital Necker.

**Figure 5.** Microscope électronique à balayage (MEB) Zeiss SUPRA55VP/Gemini (LPS)

**Figure 6.** Deux photographies d'un calcul rénal oxalocalcique type Ia obtenues sur le microscope électronique à balayage du même site avec les deux détecteurs : a) est obtenue avec le détecteur SE2, b) est obtenue avec le détecteur InLens.

**Figure 7.** Différentes morphologies observées au MEB a) annaba 135 (Sphère d'apatite); b) annaba 214 (Cystine); c) annaba 163 (urate d'ammonium); d) annaba 170 (brushite avec apatite au centre); e) annaba 222 (struvite); f) annaba52 (whewellite plus weddellite).

**Figure 8.** Excitation et désexcitation d'un atome.

**Figure 9.** Montage classique pour la fluorescence X localisé au LPS et spectre de fluorescence X tracé sous le logiciel Origine.

**Figure 10.** Exemple de spectre de Fluorescence X donné par le dispositif associé à la source portable.

**Figure 11.** Montage de diffraction neutronique G4.1 et diagrammes de diffraction neutronique.

**Figure 12.** Calcul de cystine incubé dans une solution témoin de NaCl 9g/litre

### Chapitre III : Epidémiologie

**Tableau 1:** Répartition des calculs urinaires selon le composant lithiasique majoritaire.

**Tableau 2.** La fréquence de présence des composés lithiasiques

**Tableau 3.** La fréquence des composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie.

**Tableau 4:** Répartition des calculs urinaires selon le composant lithiasique majoritaire par sexe

**Tableau 5.** La fréquence de présence des composés lithiasiques par sexe

**Tableau 6.** La fréquence des composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie.

**Figure 1:** la répartition des calculs urinaires selon le composant lithiasique majoritaire,

**Figure 2.** Fréquence des composants lithiasiques pour des calculs urinaires provenant de l'Est Algérien et de la France.

**Figure 3.** Fréquence des composants lithiasiques dans le noyau pour des calculs urinaires provenant de l'Est et de l'Ouest Algérien.

**Figure 4.** Répartition des calculs urinaires selon le constituant lithiasique majoritaire chez l'homme et chez la femme (Régions : Est d'algérie, Ouest d'algérie et la France)

**Figure 5.** Fréquence des composants lithiasiques par sexe pour des calculs urinaires provenant de l'Est Algérien et de la France.

**Figure 6.** Fréquence de présence des composants lithiasiques dans le noyau par sexe (Régions : Est d'algérie, Ouest d'algérie et la France)

## Chapitre IV : Les éléments traces

**Tableau 1:** Eléments traces présents dans les calculs calciques et non calciques (en  $\mu\text{g/g} \pm \text{écart type}$ ).

**Tableau 2:** Eléments traces présents dans les calculs urinaires calciques (en  $\mu\text{g/g} \pm \text{écart type}$ ).

**Tableau 3:** Eléments traces présents dans les calculs urinaires calciques (en  $\mu\text{g/g} \pm \text{écart type}$ ).

## Chapitre V : Effet des plantes médicinales

**Figure 1.** a : fiole contenant le calcul inséré dans un sachet immergé ; b : évolution de la masse des calculs de cystine (cercles bleus pour *Arenaria* (fleurs et tiges), triangles verts pour *Paronychia* (flowers), carrés rouges pour *Parietaria* (feuilles), triangles noirs pour *Parietaria* (fleurs), cercles blancs pour la solution aqueuse de NaCl 9 g/L) ; c : perte de masse des calculs de cystine (légendes identiques à celles de la Fig. 1b) ; d : évolution du pH durant l'expérience (légendes identiques à celles de la Fig. 1b).

**Figure 2.** Surface des cristaux visualisés par MEB : a : avant tout traitement ; b : après traitement par la solution aqueuse de NaCl 9 g/L ; c : après traitement par la solution contenant *Arenaria ammophila* ; d : après traitement par la solution contenant *Paronychia argentea* ; e : après traitement par la solution contenant *Parietaria officinalis* (fleurs) ; f : après traitement par la solution contenant *P. officinalis* (feuilles).

**Figure 3.** a : Perte de masse des calculs de Brushite (losanges bleues pour *Paronychia* (fleurs), carrés rouges pour *Parietaria* (fleurs), triangles verts pour *Arenaria* (fleurs et tiges), étoiles violettes pour *Ammi visnaga*, étoiles bleues pour la solution aqueuse de NaCl 9 g/L) ; b : évolution du pH durant l'expérience (légendes identiques à celles de la Fig. 1a).

**Figure 4.** Surface des cristaux visualisés par MEB: a) avant tout traitement ; b) après traitement par la solution contenant *Paronychia argentea* ; c) après traitement par la solution contenant *Arenaria ammophila*; d) après traitement par la solution contenant *Ammi Visnaga*; e) après traitement par la solution contenant *Parietaria officinalis* ; f) après traitement par la solution aqueuse de NaCl 9g/L.

**Figure 5.** Perte de masse des calculs d'oxalate de calcium type Id

**Figure 6.** Surface des cristaux visualisés par MEB: a) avant tout traitement ; b) après traitement par la solution contenant *Ammi Visnaga* ; c) après traitement par la solution contenant Madélithiole IMR 2000 (racines non traitées) ; d) après traitement par la solution contenant Madélithiole IMR 2000 (racines traitées par  $\text{CHCl}_3$ ); e) après traitement par la solution aqueuse de NaCl 9g/L; f) après traitement par la solution aqueuse de citrate.