

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
en Sciences

Option : Biochimie appliquée

THEME

**Incidence de la lithiase oxalo-calcique urinaire au niveau
de la région Est Algérien :
Exploration métabolique et approche prophylactique**

Présentée par : LEKOUAGHET Asma

Directeur de thèse : Mr. BOUTEFNOUCHET Abdelatif

Professeur, Université d'Annaba

Co-encadreur : Mme. BOUMENDJEL Amel

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : Mr. MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : Mme. SOUIKI Lynda

Professeur, Université de Guelma

Mme. BOUDJELAL Amel

MCA, Université de M'sila

Mme. BOUSSEKINE Samira

MCA, Université de Tebbesa

N° DBCH...../2020

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

A ALLAH

Je remercie tout d'abord *ALLAH* le tout puissant, pour m'avoir donné la santé, la patience et la force pour réaliser ce travail.

A mon directeur de thèse

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur *BOUTEFNOUCHET Abdelatif*, Professeur à l'université d'Annaba, pour m'avoir accepté dans son équipe de recherche et m'avoir fait confiance tout au long de ce doctorat. Je n'oublie pas l'aide précieuse qu'il m'a apporté dans la réalisation de ce travail et sa disponibilité jusqu'à la fin malgré ses occupations. Sans sa méthodologie, ses orientations et ses conseils précieux, cette thèse n'aurait pas été accomplie. Je tiens donc à lui dire que je suis infiniment reconnaissante.

A mon co-encadreur

A madame *BOUMENDJEL Amel*, Professeur à l'université d'Annaba, je vous remercie pour l'honneur que vous me faites, en acceptant d'être co-encadreur.

Aux membres du jury

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur *MESSARAH Mahfoud*, Professeur à l'université d'Annaba, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes sincères remerciements vont également à Mesdames, *SOUIKI Lynda*, Professeur à l'université de Guelma, *BOUSSEKINE Samira*, Maitre de conférence A à l'université de Tebbesa et *BOUDJELAL Amel*, Maitre de conférence A à l'université de M'sila d'avoir accepté sans ménagement d'évaluer ce travail de recherche et d'être membres de mon jury de soutenance. Je les remercie également pour la disponibilité qui m'en accordé malgré leur éloignement et leurs nombreuses charges.

Aux responsables des laboratoires de recherche

Je remercie sincèrement mon maitre de stage Monsieur *DAUDON Michel*, Responsable du Laboratoire des Lithiases de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, pour son accueil et son accompagnement avec beaucoup de patience et de pédagogie. Il m'a permis

d'assister aux différents cours de DU sur la lithiase urinaire. A travers lui, je remercie également tous les techniciens et membres de ce laboratoire.

Je suis également très reconnaissante au Professeur *HAMANA Djamel*, Responsable de l'Unité de Recherche Sciences des Matériaux et Applications à l'université de Constantine, dans laquelle beaucoup de travaux de cette thèse ont pu être réalisés.

Mes remerciements s'adressent aussi au Professeur *DAHDOUH Abderezzak*, Médecin et Professeur en Urologie pour ses encourageants permanents, son accueil au sein du service d'urologie à l'hôpital Daksi de Constantine et son aide précieuse.

Une attention particulière est adressée aux urologues du service d'urologie du CHU d'Ibn Rochd d'Annaba et à leur tête Professeur *KADI Abdelkarim* et Professeur *CHETTIBI Kheireddine* pour tous les efforts consentis dans le domaine de la lithiase urinaire et l'aide précieuse et le soutien sans faille apportés à notre équipe.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur *BENSOUICI Chawki*, Responsable du Laboratoire de Biochimie et Chef de l'équipe de Pharmacologie et Toxicologie (Division Biotechnologie et Santé) à CRBt-Constantine, de m'avoir accueillie et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire. Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire, et plus particulièrement à *GALI Lynda* et *DJEGHIM Hannène*.

A notre équipe de recherche

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail :

A KHARROUBI Latifa, Pharmacienne Assistante à l'hôpital Ibn Rochd -Annaba-. Merci d'avoir été à mes côtés au début de mon travail de recherche. Merci pour ta gentillesse, ta douceur, ta bonté, ton sourire. Je te souhaite un avenir radieux.

A GHENAIET Khaoula, Doctorante en microbiologie, à l'université d'Annaba. Merci pour ton soutien et tes encouragements. Merci également pour tous les moments partagés depuis ces nombreuses années. Je te souhaite une bonne fin de thèse, beaucoup de bonheur et de réussite.

A KENNOUZE Abdelhalim, Ingénieur de laboratoire des lithiases urinaires à l'hôpital Daksi-Constantine. Merci pour ta disponibilité, ta sérénité et ton aide dans l'analyse des calculs urinaires.

A MECHERI Rym, Maitre de Conférences à l'université d'Annaba. Merci pour ta participation à ce travail.

A mes collègues

Un grand merci à *KLIBET Fahima*, Maitre de Conférence B à l'université de Constantine, et *TICHATI Lazhari*, Docteur en santé environnementale, pour votre grande aide.

Merci à *DJEDIOUI Abdallah*, *LAOUAR Amel*, *BADACHE Soumeya*, *YOUCEF KHOUDJA Zeineb*, *MEHAMDIA Dounia Zed*, pour leur soutien et leur aide.

A ma famille

Merci pour tout. Merci pour votre amour, pour votre soutien et pour vos encouragements. Merci d'être à mes côtés, d'être là pour moi.

À toutes celles et ceux que j'oublie forcément, merci pour tout.

Dédicace

Je dédie cette thèse

A Monsieur BOUTEFNOUCHET Abdelatif à qui j'éprouve beaucoup d'estime

A ma très chère Maman : Nafissa

A mon cher père : Youcef

A mes frères et sœurs: Ilyes, Yacine, Wafa et Selma

A mes belles sœurs : Basma et Ichrak

A mes neveux : Iyed, Hatem et Abderrahim

Résumé

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude de la lithiase urinaire en Algérie par l'étude de la lithiase calcique au niveau de la région Est Algérien. Différents aspects ont été considérés dont le premier traite l'analyse des éléments de lithiase suivi d'une étude de diagnostic sur des cas cliniques pour finalement considérer des mesures préventives via un traitement prophylactique en utilisant une plante médicinale.

Les calculs ont été analysés selon une approche morphologique et constitutionnelle et deux cohortes d'éléments lithiasiques ont été considérées : la première est composée de 953 cas de lithiases de l'arbre urinaire et la seconde de 1067 cas de lithiase du haut appareil urinaire. Il ressort de cette analyse une prédominance nette de la lithiase oxalocalcique pour les deux sexes. Ces produits orientent généralement vers un contexte étiopathologique d'hyperoxalurie (Whewellite) et d'Hypercalciurie (Weddellite + Carapatite). En outre, une étude plus exhaustive sur les calcifications ectopiques (plaque de Randall) a été entreprise pour cerner son ampleur au niveau de la région Est-Algérien. Il se trouve que cette forme de lithogénèse touche environ 30% de la lithiase oxalocalcique majoritaire pour les deux sexes confondus comme on a constaté qu'elle concerne une frange importante de sujets lithiasiques jeunes (Homme : 26.9%, Femme : 39.1%).

Pour une prise en charge préventive, on a évalué les effets antilithiasique, antioxydant et anti-inflammatoire, *in vitro*, des racines de *Leuzea conifera* L (famille ; Asteraceae). Cette étude a été étalée à l'identification des principes actifs mis en cause dans ces effets prophylactiques. Les résultats montrent que les racines de *Leuzea conifera* L sont riches en polyphénols et en flavonoïdes totaux qui ont contribué à l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire observées dans les différents extraits de la plante. Le test de dissolution des calculs d'oxalate de calcium, *in vitro*, montre que l'extrait de la plante n'a pas exercé un effet remarquable sur la dissolution de ces calculs. Par contre, un effet inhibiteur important a été enregistré sur la cristallisation oxalocalcique. Cela nous a permis de conclure que les racines de *Leuzea conifera* L présentent un pouvoir inhibiteur sur la cristallisation oxalocalcique et douées d'une activité antioxydante et anti-inflammatoire notable.

Mots clés : Whewellite, morpho-constitutionnelle, cristallisation, oxalate de calcium, *Leuzea conifera*

Abstract

This work is a contribution to highlight the urinary lithiasis in Algeria, more particularly, this research attempts to study calcium lithiasis in Algeria's Eastern Region. Different aspects have been considered, the first of which deals with the analysis of lithiasis elements, followed by a diagnostic study on clinical cases and finally evaluates the overall beneficial effects of prophylactic therapy using a medicinal plant.

The analysis of stones was performed in accordance to a morphological and constitutional approach and two cohorts of lithiasic elements were considered: the first is composed of 953 cases of lithiasis of the urinary system and the second is composed of 1067 cases of upper urinary tract calculi. This analysis showed a clear predominance of calcium oxalate stones for both sexes. These results generally point to an etiopathological context of hyperoxaluria (Whewellite) and hypercalciuria (Weddellite + Carabapatite). Moreover, an exhaustive study on ectopic calcifications (Randall's Plaque) was carried out to demonstrate its extent in Algeria's Eastern Region. It turns out that this form of lithogenesis affects about 30% of the majority of oxalocalcic lithiasic for both sexes combined, as it was found to affect an important fringe of young lithiasic subjects (Male : 26.9%, Female : 39.1%).

Furthermore, the present study assessed the preventive potential of *Leuzea conifera* L roots (family; Asteraceae) in modulating of calcium lithiasis by examining in vitro its antilithiasic, antioxidant and anti-inflammatory activities. This study was extended to the identification of the active compounds involved in these prophylactic properties. The results show that *Leuzea conifera* L roots are rich in polyphenols and total flavonoids which contributed to the antioxidant and anti-inflammatory activities observed in the various extracts of the plant. The dissolution test of calcium oxalate stones in vitro shows that the plant extract did not have a notable effect on the dissolution of calcium oxalate stones. Adversely, an important inhibitory effect was recorded on the oxalocalcic crystallization. In conclusion, these results indicated that *Leuzea conifera* L roots has a powerful inhibitory effect on the oxalocalcic crystallization as well as a potent antioxidant and anti-inflammatory activities. Thus, *Leuzea conifera* L may offer a significant potential for clinical application in managing calcium lithiasis.

Keywords: Whewellite, morpho-constitutional, crystallization, calcium oxalate, *Leuzea conifera* L

هذا العمل هو مساهمة في دراسة حصى الكلى في الجزائر من خلال دراسة حصى الكالسيوم في منطقة الشرق الجزائري. تم النظر في جوانب مختلفة ، أولها يتناول تحليل عناصر الحجارة تليها دراسة تشخيصية للحالات السريرية وأخيراً التدابير والعلاج الوقائي باستخدام نبات طبي.

تم تحليل حصى الكلى باستخدام دراسة مورفولوجية وبنوية ، وتم النظر في مجموعتين : الأولى تتكون من 953 حالة حصوات في المسالك البولية والثانية من 1067 حالة من حصوات المسالك البولية العلوية. يوضح هذا التحليل غلبة واضحة لأكسالات الكالسيوم لكلا الجنسين. تشير هذه المنتجات عمومًا إلى السياق المرضي لفرط أوكسالات البول (Whewellite) والكالسيوم الزائد في البول (Weddellite + Carapatite). بالإضافة إلى ذلك ، تم إجراء دراسة أكثر شمولاً حول التكلسات المتمثلة في (لوحة راندال) لتحديد مدى انتشارها على مستوى منطقة الشرق الجزائري. اتضح أن هذا الشكل من التكوّن الحصى يؤثر على ما يقارب 30% من حصوات أكسالات الكالسيوم الغالبية لكلا الجنسين ، حيث لوحظ أنه يتعلق بمجموعة كبيرة من الأشخاص الصغار المصابين بالحصيات (ذكور: 26.9% ، إناث: 39.1%).

من أجل التدبير الوقائي، تم تقييم التأثيرات المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات، في المختبر، لجذور *Leuzea conifera* L (عائلة: Asteraceae). تم تمديد هذه الدراسة لتحديد المكونات النشطة المشاركة في هذه الآثار الوقائية. أظهرت النتائج أن جذور نبات *Leuzea conifera* L غنية بالبوليفينول والفلافونيدات الكلية التي ساهمت في النشاط المضاد للأكسدة والالتهابات الذي لوحظ في مستخلصات النبات المختلفة. أظهر اختبار انحلال حصوات أكسالات الكالسيوم في المختبر أن المستخلص النباتي لم يكن له تأثير ملحوظ على إذابة هذه الأحجار. من ناحية أخرى ، تم تسجيل تأثير مثبط معنوي على تبلور أوكسالوكالسيك. سمح لنا هذا باستنتاج أن جذور *Leuzea conifera* L لها قوة مثبطة على تبلور أوكسالوكالسيك وتمنح نشاطاً ملحوظاً مضاداً للأكسدة ومضاداً للالتهابات

الكلمات المفتاحية Whewellite ، مورفولوجية وبنوية ، التبلور ، أكسالات الكالسيوم ، *Leuzea conifera*

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur la lithiase urinaire	3
I.1. Définition	3
I.2. Historique de la lithiase urinaire	3
I.3. Prévalence et incidence de la lithiase de l'arbre urinaire	4
I.4. Lithogénèse	5
<i>I.4.1. Sursaturation urinaire</i>	<i>5</i>
<i>I.4.2. Germination ou nucléation cristalline</i>	<i>6</i>
<i>I.4.3. Croissance cristalline</i>	<i>6</i>
<i>I.4.4. Agrégation des cristaux</i>	<i>6</i>
<i>I.4.5. Agglomération cristalline</i>	<i>7</i>
<i>I.4.6. Rétention des particules cristalline</i>	<i>7</i>
<i>I.4.7. Croissance et évolution du calcul</i>	<i>7</i>
I.5. Promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation	7
I.6. Facteurs de risque de la lithiase urinaire	10
I.7. Classification morpho-constitutionnelle et orientations étiologiques	10
II. Lithiase d'oxalate de calcium	17
II.1. Calcium, oxalate et lithiase oxalocalcique	17
II.2. Les différents types de calculs oxalocalciques	20
II.3. Causes principales de lithiase oxalocalcique	22
<i>II.3.1. Etiologies de l'hyperoxalurie</i>	<i>23</i>
<i>II.3.1.1. L'hyperoxalurie entérique</i>	<i>23</i>
<i>II.3.1.2. L'hyperoxalurie diététique</i>	<i>23</i>
<i>II.3.1.3. L'hyperoxalurie primaire</i>	<i>23</i>

II.3.2. Etiologies de l'hypercalciurie	25
II.3.2.1. L'hypercalciurie liée aux facteurs alimentaires (type I de Pak).....	25
II.3.2.2. L'hypercalciurie d'absorption (type 2 de Pak)	25
II.3.2.3. L'hypercalciurie par fuite rénale du calcium (type III de Pak).....	26
II.4. Relation entre type morphologique des calculs oxalocalciques et pathologies associées	27
II.4.1. Pour la whewellite	27
II.4.2. Pour la weddellite	27
II.5. Les cristaux d'oxalate de calcium	29
II.6. Influence de l'oxalate et du calcium dans la cristallisation oxalocalcique	33
II.7. Traitement de lithiase oxalocalcique	34
II.7.1. Traitement préventif.....	34
II.7.2. Traitement curatif	35

PARTIE PRATIQUE

I. Etude épidémiologique de la lithiase urinaire dans la région Est-Algérien	38
I.1.Introduction	38
I.2.Matériel et méthodes	38
I.2.1.Calculs de l'arbre urinaire	38
I.2.2. Analyse des calculs	39
I.2.2.1.Examen morphologique	39
I.2.2.2.Analyse infrarouge	39
I.3. Résultats de l'analyse constitutionnelle de calculs	42
I.3.1. Localisation des calculs et ratio Homme/Femme	42
I.3.2. Composition globale des calculs urinaires	42
I.3.3. Composants majoritaires dans les calculs	44
I.3.3.1. Influence du sexe.....	44
I.3.3.2. Influence de l'âge.....	45
I.3.4. Composants majoritaires dans le noyau	46
I.3.4.1. Influence du sexe.....	47
I.3.4.2. Influence de l'âge.....	47
I.4. Résultats de l'examen Morphologique	48
I.4.1. Observations par loupe binoculaire	48

<i>I.4.2. Observations par microscope électronique à balayage (MEB)</i>	53
I.5. Résultats de l'évaluation par typage morphologique	57
I.6. Discussion	61
I.7. Conclusion	67
II- Lithiase induite par calcification papillaire (Plaque de Randall)	68
II.1.Introduction	68
II.2. Matériel et méthodes	68
II.3. Résultats	69
<i>II.3.1. Prévalence des calculs formés sur PR</i>	69
<i>II.3.2. Prédominance par sexe</i>	70
<i>II.3.3. Composition des plaques de Randall</i>	71
<i>II.3.4. Composition des calculs</i>	71
II.4. Discussion	73
II.5. Conclusion	77
III. Etude des cas cliniques d'hyperoxalurie primaire	78
III.1.Introduction	78
III.2. Matériel et méthodes du bilan étiologique	78
III.3. Résultats	80
III.4. Discussion	87
III.5. Conclusion	91
IV. Etude des effets litholytique, antioxydant et anti-inflammatoire, in vitro des racines de <i>Leuzea conifera</i> L	
IV.1. Etude phytochimique des racines de <i>Leuzea conifera</i>	92
<i>IV.1.1. Introduction</i>	92
<i>IV.1.2. Matériel et méthodes</i>	93
<i>IV.1.2.1- Matériel végétal</i>	93
<i>IV.1.2.2. Tests de mise en évidence des principes actifs de <i>Leuzea conifera</i></i>	94
<i>IV.1.2.3. Dosage des éléments minéraux</i>	95
<i>IV.1.2.4. Préparation des différents extraits à partir des racines de <i>Leuzea conifera</i></i>	95

IV.1.2.4.1. Extrait aqueux	95
IV.1.2.4.2. Extrait hydro-alcoolique	95
<i>IV.1.2.5. Dosage des composés phénoliques</i>	97
IV.1.2.5.1. Dosage des polyphénols totaux	97
IV.1.2.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux	97
<i>IV.1.2.6. Analyse statistique</i>	98
IV.1.3. Résultats	98
<i>IV.1.3.1. Principaux constituants chimiques des racines de <i>Leuzea conifera</i></i>	98
<i>IV.1.3.2. Dosage des éléments minéraux</i>	98
<i>IV.1.3.3. Teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux</i>	99
IV.1.4. Discussion	100
IV.1.5. Conclusion	102

IV.2. Etude de l'effet litholytique de l'extrait aqueux des racines de <i>Leuzea conifera</i>	103
IV.2.1. Introduction	103
IV.2.2. Matériel et méthodes	104
<i>IV.2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux</i>	104
<i>IV.2.2.2. Dissolution des calculs d'oxalate de calcium</i>	104
<i>IV.2.2.3. Dissolution des calculs de cystine</i>	104
<i>IV.2.2.4. Taux de dissolution</i>	105
<i>IV.2.2.5. Suivi du pH</i>	105
IV.2.3. Résultats	105
<i>IV.2.3.1. Calculs d'oxalate de calcium monohydraté (<i>Whewellite</i>)</i>	105
IV.2.3.1.1. Evolution du taux de dissolution	105
IV.2.3.1.2. Evolution du pH	106
IV.2.3.1.3. Observation micrographique et analyse spectrophotométrique	107
<i>IV.2.3.2. Calculs cystiniques</i>	110
IV.2.3.2.1. Evaluation du taux de dissolution	110
IV.2.3.2.2. Evolution du pH	110
IV.2.3.2.3. Observation micrographique	111
IV.2.4. Discussion	113
IV.2.5. Conclusion	115

IV.3. Test d'inhibition cristalline in vitro de l'oxalate de calcium par les extraits des racines de <i>Leuzea conifera</i>	116
IV.3.1. Introduction	116
IV.3.2. Matériel et méthodes	116
IV.3.2.1. Essais sans inhibiteur.....	116
IV.3.2.2. Essais d'inhibition cristalline avec les extraits/fractions de plante.....	117
IV.3.2.3. Pourcentage d'inhibition.....	117
IV.3.2.4. Observation microscopique.....	117
IV.3.3. Résultats	117
IV.3.3.1. Cinétique de cristallisation de l'oxalate de calcium in vitro en présence et en absence des extraits aqueux des racines de <i>Leuzea conifera</i>	117
IV.3.3.2. Observations microscopiques.....	120
IV.3.4. Discussion	123
IV.3.5. Conclusion	125
IV.4. Etude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits aqueux et organiques des racines de <i>Leuzea conifera</i>	126
IV.4.1. Introduction	126
IV.4.2. Matériel et méthodes	126
IV.4.2.1. Evaluation in vitro de l'activité anti-oxydante.....	126
IV.4.2.2. Activité anti-inflammatoire.....	129
IV.4.3. Résultats	130
IV.4.3.1. Activités anti-oxydantes.....	130
IV.4.3.2. Activité anti-inflammatoire.....	130
IV.4.3. Discussion	131
IV.4.4. Conclusion	134
Conclusion générale et perspectives	135
Références bibliographie	138
Annexes	156
Liste des publications et des communications	

Les abréviations

2,8-DHA : 2,8- dihydroxyadénine

AGXT : Alanineglyoxylate-aminotransférase

AUA : AU0 ou acide urique anhydre

AUD : AU2 ou acide urique dihydraté

BHA: Butylhydroxytoluen.

BHT: Butylhydroxyanisol

C1 : Whewellite ou oxalate de calcium monohydraté

C2 : Weddellite ou oxalate de calcium dihydraté

C3 : Oxalate de calcium trihydraté

CA : Carbapatite

CaOx: Oxalate de calcium

CUPRAC: Cupric reducing antioxidant capacity

DO : Densité optique

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ECBU : Examen cytobactériologique des urines

Fig : Figure

GRHPR : Glyoxylate Réductase / Hydroxypyruvate Réductase

H/F : Rapport Homme/Femme

HOGA1 : 4-Hydroxy-2-Oxoglutarate Aldolase 1

I % : Taux d'inhibition

IRTF : Infrarouge à transformé de fourrier

LEC : Lithotritie extracorporelle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

Ox : Oxalate

PACC : Phosphates amorphes de calcium carbonatés

PAM : Phosphate ammoniac magnésien

PTH : Parathormone ou hormone parathyroïdienne

SU.VI.MAX: SUplémentation en VItamines et Minéraux AntioXydants

UAC : Urate amorphe complexe

Wd: Weddellite

Wh: Whewellite

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification morpho-constitutionnelle des calculs urinaires selon Daudon et al., 2012.....	12
Tableau 2: Teneur en oxalate (en mg/100g) de quelques aliments.....	18
Tableau 3: Teneur en calcium des produits laitiers et de quelques aliments.....	20
Tableau 4: Principales causes de lithiases oxalocalciques.....	22
Tableau 5: Sensibilité au pH et pH moyen d'observation des espèces cristallines oxalocalciques.....	29
Tableau 6: Caractéristiques des cristaux urinaires d'oxalate de calcium et signification clinique.....	32
Tableau 7: Justification des mesures thérapeutiques vis-à-vis des lithiases rénales.....	35
Tableau 8 : Techniques urologiques, indication et complication.....	36
Tableau 9: Distribution selon la localisation anatomique des calculs.....	42
Tableau 10: Sexe-ratio H/F selon les tranches d'âge et la localisation anatomique.....	42
Tableau 11: Fréquence de présence des constituants dans les calculs selon le sexe des patients.....	44
Tableau 12: Fréquence des constituants majoritaires dans les calculs selon le sexe des patients.....	45
Tableau 13: Fréquence des constituants majoritaires dans le calcul selon l'âge et le sexe des patients.....	46
Tableau 14: Fréquence des constituants majoritaires des noyaux selon le sexe des patients.....	47
Tableau 15: Fréquence des constituants majoritaires dans le noyau selon l'âge et le sexe des patients.....	48
Tableau 16: Fréquences des types morphologiques et leurs associations au noyau et en surface des calculs urinaires selon le sexe.....	58
Tableau 17 : Fréquence de présence de sous types et associations de sous types des calculs calciques selon le sexe.....	59
Tableau 18 : Estimation des principales orientations étiologiques évaluée selon l'approche morpho constitutionnelle de M Daudon.....	60
Tableau 19 : Estimation des orientations étiologiques de la lithiase calcique évaluée selon l'approche morpho constitutionnelle de M Daudon.....	60

Tableau 20 : Incidence des calculs rénaux ombiliqués et distribution selon l'âge et le sexe des patients.....	70
Tableau 21 : Composition des PR.....	71
Tableau 22 : Composition des calculs ombiliqués.....	72
Tableau 23 : fréquence des constituants (présence et majoritaire) dans les calculs ombiliqués.....	72
Tableau 24 : Analyse morpho-constitutionnelle des calculs du patient 1.....	81
Tableau 25 : Analyse morpho-constitutionnelle des calculs du patient 2.....	82
Tableau 26 : Etude de la cristallurie des urines du réveil du patient1.....	83
Tableau 27 : Etude de la cristallurie des urines du réveil du patient 2.....	84
Tableau 28 : Résultats de l'analyse des urines de 24 heures des patients 1 et 2.....	85
Tableau 29 : Position systématique de la plante <i>Leuzea conifera</i>	93
Tableau 30 : Screening phytochimique des extraits aqueux de <i>Leuzea conifera</i>	98
Tableau31 : Constituants minéraux présents dans les racines de <i>Leuzea conifera</i>	99
Tableau 32 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des différents extraits/fractions des racines de <i>Leuzea conifera</i>	100
Tableau 33 : Valeurs du pH mesurées le long de huit semaines d'expérimentation.....	106
Tableau 34 : Valeurs du pH mesurées le long de huit semaines d'expérimentation.....	111
Tableau 35 : Pourcentage d'inhibition de la cristallisation oxalocalcique, en présence des différents extraits de <i>L.conifera</i> et de citrate.....	118
Tableau 36 : Activités antioxydantes des extraits/fractions des racines de <i>L conifera</i>	130
Tableau 37 : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits/fraction des racines de <i>L conifera</i>	131

Liste des figures

Figure 1: Principales étapes de la lithogénèse.....	8
Figure 2: Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines.....	10
Figure 3: Nature des mécanismes d'inhibition cristalline en regard des différentes étapes de la lithogénèse.....	10
Figure 4: Métabolisme de l'acide oxalique chez l'homme.....	18
Figure 5: Métabolisme du calcium.....	19
Figure 6: Aspect macroscopique, spectrophotométrie infrarouge et représentation de la structure cristalline de la whewellite (COM), weddellite (COD) et caoxite (COT).....	21
Figure 7: Voies métaboliques conduisant à la surproduction d'oxalate dans les hyperoxaluries primaires de types 1 (HP1), 2 (HP2) et 3 (HP3).....	24
Figure 8: Interprétation du test de charge orale en calcium (test de Pak-Broadus).....	26
Figure 9: Types morphologiques des calculs oxalocalciques.....	28
Figure 10: Cristaux d'oxalate de calcium vus au microscope optique à polarisation.....	30
Figure 11: Faciès cristallins utilisés pour calculer le volume cristallin global de l'oxalate de calcium (VCG oxca).....	31
Figure 12: Influence relative de la concentration de calcium et d'oxalate sur le risque relatif de former des cristaux de COM (Fig.12A) et de COD (Fig.12B) dans l'urine des formateurs de pierres.....	33
Figure 13 : Représentation schématique des zones de risques métaboliques en fonction du produit et du rapport molaires oxalocalciques.....	34
Figure 14 : Zone géographique.....	39
Figure 15: Matériel et accessoires utilisés dans l'analyse morphologique et infrarouge des calculs urinaires.....	41
Figure 16: Répartition en nombre des calculs urinaires selon leur localisation et l'âge des patients.....	43
Figure 17: Calculs urinaires mettant en évidence différents stades de la conversion cristalline de la Weddellite vers la Whewellite.....	50
Figure 18: Calculs urinaires formés dans un contexte d'hypercalciurie + Hyperoxalurie +Hypocitraturie.....	51

Figure 19 : Micrographies de calculs urinaires révélant différentes structures observées lors de l'examen micrographique par loupe binoculaire.....	52
Figure 20 : Sphérules de carapatite formées dans un contexte d'infection urinaire à germes uréasiques et présentant des empreintes en surface (a) et celles formées dans un contexte d'hypercalciurie dépourvue d'empreintes en surface (b).....	54
Figure 21: Micrographies de calculs urinaires révélant l'influence des conditions de lithogenèse sur la forme des cristallites des composants urinaires et la diversité des modes de leur association.....	55
Figure 22 : Cristallite de weddellite observée lors d'hypercalciurie majeure.....	56
Figure 23 : Aiguilles d'urate d'ammonium en forme d'oursin formées dans un contexte de mal nutrition en présence de whewellite (a) et formé dans un contexte d'infection urinaire à germes uréasiques en présence de struvite (b).....	57
Figure 24 : Exemples de calculs ombiliqués.....	69
Figure 25: Comparaison des Ratios H/F.....	70
Figure 26 : Proportions des calculs oxalocalciques développés sur une plaque de Randall par rapport à l'ensemble des calculs oxalocalcique majoritaires selon l'âge et le sexe des patients	73
Figure 27 : Microscope à polarisation avec cellule de malassez et son dispositif de photographie.....	79
Figure 28 : Calculs d'oxalate de calcium monohydraté de sous-types Ia (a) et Ic (b, c) observé sous microscope optique.....	81
Figure 29 : Calculs d'oxalate de calcium monohydraté (sous-types Id et Ic) observé sous microscope optique (a, b).....	82
Figure 30 : Cristallurie et mise en évidence d'une abondance des cristaux d'oxalate de calcium (a) de forme globulaire (Whewellite) individualisés et regroupés en agrégats (b) avec la présence de quelques cristaux bipyramidaux de weddellite (c) et des cristaux à faciès pseudo-hexagonaux de caoxite (oxalate de calcium trihydraté) (d, e)....	83
Figure 31: Nomogramme de cristallisation oxalocalcique. Détermination de la zone de risque cristallogène des cas cliniques 1 et 2).....	86
Figure 32: Répartition géographique du <i>Leuzea conifera</i>	92
Figure 33 : Localisation géographique de <i>Leuzea conifera</i>	93
Figure 34 : <i>Leuzea conifera</i>	93
Figure 35: Les étapes du fractionnement de l'extrait brut des racines de <i>Leuzea conifera</i>	96

Figure 36 : Taux de dissolution massique des calculs de whewellite dans l'extrait aqueux de <i>L. conifera</i> à différentes concentrations et dans la solution témoin de NaCl (9g/l).....	106
Figure 37 : Surface des calculs de whewellite observée sous MEB : Etat initial sans traitement (a et b), après séjours de 8 semaines dans la solution témoin de NaCl (c et d) et après séjours de 8 semaines (S8) dans l'extrait aqueux des racines de <i>Leuzea conifera</i> (c et d).....	108
Figure 38 : Analyse IRTF de la Surface des calculs de whewellite.....	109
Figure 39 : Taux de dissolution massique des calculs de cystine dans l'extrait aqueux de <i>L. conifera</i> à différentes concentrations et dans la solution témoin de NaCl (9g/l).....	110
Figure 40 : Micrographies visualisées par MEB de l'état de surface des calculs cystiniques : (a, b) avant traitement, (c, d) après séjours de huit semaines dans une solution aqueuse de NaCl, (e, f) après séjours de huit semaines dans l'extrait de <i>Leuzea conifera</i>	112
Figure 41 : Variation de l'absorbance des extraits de la plante à différentes concentrations en fonction du temps.....	119
Figure 42 : Micrographies de la cristallisation en absence de l'inhibiteur.....	121
Figure 43 : Micrographies de la cristallisation en présence de l'inhibiteur (macérât à 1mg/ml).....	122
Figure 44 : Transformation du radical DPPH• en DPPHH.....	127
Figure 45 : Réduction du complexe chromogène de Cu ⁺² -Nc.....	129

Introduction Générale

Introduction générale

La lithiase rénale résulte de l'un des désordres les plus communs du système urinaire. Elle a affecté l'humanité depuis les temps les plus reculés comme elle est actuellement la troisième affection urologique la plus courante dans le monde (Alatab *et al*, 2016). Elle se caractérise par la formation de concrétions cristallines se développant dans le bassinet et/ou les calices du rein et conduisant à une obstruction partielle ou totale de l'écoulement normal de l'urine. Le mode de révélation est variable, allant de la bruyante crise de colique néphrétique à la lithiase asymptomatique fortuitement révélée.

La formation de lithiase rénale est un événement fréquent dans tous les pays, développés ou en voie de développement, avec une prévalence variant entre 3,5 % et 18 % (Stamatelou *et al*, 2003 ; Daudon *et al*, 2008). Cette pathologie est caractérisée par un risque accru de récurrence, des mécanismes physiopathologiques complexes et des étiologies multifactorielles (Prezioso *et al*, 2014 ; Ahmed *et al*, 2016).

Le calcul urinaire se forme sur une période de temps plus ou moins prolongée (plusieurs semaines à plusieurs années). Il conserve en son sein l'empreinte de tous les facteurs lithogènes qui contribuent à sa formation. Il est, de ce fait, la clé de toute enquête étiologique établissant le ou les processus intervenant dans sa lithogénèse. Cependant, afin de comprendre la physiopathologie des processus lithiasiques, il est nécessaire d'effectuer une analyse complète et fiable du calcul (aspect morphologique et constitutionnel) ainsi qu'une évaluation des paramètres biologiques du patient lithiasique et l'analyse de sa cristallurie (Courbebaisse *et al*, 2016).

Quelle que soit leur nature, les calculs rénaux peuvent provoquer une obstruction des voies urinaires ou des infections parfois graves et leur négligence peut entraîner, dans des situations extrêmes, une insuffisance rénale chronique. Le traitement de la lithiase repose principalement sur deux axes: le premier est celui de l'élimination du calcul et le second est celui de l'approche thérapeutique pour le traitement des causes lithogènes notamment, et principalement, en cas de lithiase récidivante (Kourilsky, 2014). Au cours des 20 dernières années cette approche, dans le traitement médical et préventif de la lithiase rénale, est préconisée. Elle est basée sur une enquête étiologique établie systématiquement pour chaque cas lithiasique comprenant l'analyse du calcul et la recherche des facteurs de risque lithogène à partir des données cliniques, radiologiques et biologiques (Traxer, 2012).

Le traitement urologique de la lithiase urinaire a connu un essor considérable aussi bien en termes de diversité et de spécificité des techniques que dans leur développement et

modernisation. L'avancée dans la prise en charge préventive de la récurrence lithiasique n'a malheureusement pas connu le même élan. De ce fait, le coût engendré par cette prise en charge thérapeutique constitue un véritable problème en santé publique à cause du caractère récidivant de la lithiase rénale (Traxer, 2012).

En Algérie, le recours à la médecine douce, comme mesure prophylactique, est largement sollicité dans le traitement de certaines maladies dont la lithiase de l'arbre urinaire. L'utilisation des plantes médicinales en automédication ne cesse de progresser et une proportion non négligeable de la population opte pour les plantes médicinales et les produits naturels pour se soigner. Cependant, l'usage actuel des plantes médicinales comme recours thérapeutique, est mal documenté et basé principalement sur les recommandations des herboristes. Dans ce cas, les supposées vertus thérapeutiques de certaines plantes trouvent leur origine dans les connaissances empiriques issues de l'usage traditionnel au sein de la population ou encore dans les croyances propres à la culture ethnique inhérente à chaque région du pays (Amar et al, 2010 ; Djaroud et al, 2012). Dans ce sens, le recours aux plantes peut être d'un secours certain pour traiter et prévenir certains types de lithiase de l'arbre urinaire pourvu que leur utilisation soit basée sur des résultats scientifiques bien établis.

Dans la présente étude on a fixé comme premier objectif l'étude de plusieurs aspects épidémiologiques de la lithiase de l'arbre urinaire dans la région Est Algérien en mettant en relief la lithiase calcique. Notre second objectif s'est focalisé sur l'utilisation d'une plante médicinale (*Leuzea conifera* L) et l'étude de son effet litholytique sur certains types de lithiase de l'arbre urinaire.

Dans la présentation de cette thèse, on a distingué deux parties :

La première partie est consacrée à l'étude bibliographique qui traite :

- des généralités sur la lithiase de l'arbre urinaire.
- de la lithiase oxalocalcique

La deuxième partie est consacrée à nos travaux personnels comprenant quatre parties :

- Partie 1 : consacrée à l'étude de la lithiase urinaire au niveau de la région Est-Algérien et comporte une étude morpho-constitutionnelle des calculs urinaires et la détermination de leurs principales orientations étiologiques.
- Partie 2 : consacrée à la lithiase induite par calcification papillaire (Plaque de Randall)
- Partie 3 : présente des cas cliniques d'hyperoxalurie primaire
- Partie 4 : consacrée à l'étude *in vitro* des effets des extraits des racines de *Leuzea conifera* L sur la dissolution des calculs oxalocalciques, inhibition de la cristallisation oxalocalcique, inflammation et stress oxydant.

Etude

Bibliographique

I. Généralité sur la lithiase urinaire

I. 1. Définition

Le terme de la lithiase urinaire désigne la maladie résultante de la formation des calculs dans les reins ou les voies urinaires. Le mot lithiase vient du grec *lithos* (pierre) et celui de calcul du latin *calculus*, nom des petits cailloux utilisés par les comptables romains. Pendant longtemps, la lithiase urinaire a été appelée maladie de la pierre, la plupart des calculs ressemblant, en effet, à des pierres dont ils ont la dureté. Elle était souvent aussi désignée sous le nom de gravelle, car les concrétions d'acide urique trouvées dans les urines ressemblaient à de petits graviers (Daudon et al, 2012).

I.2. Historique de la lithiase urinaire

La lithiase urinaire est connue depuis la plus haute antiquité. Très peu de données épidémiologiques sur la lithiase urinaire sont disponibles avant la fin du XIX siècle. Les grandes séries de calculs qui ont fait l'objet de communications dans les sociétés savantes européennes de l'époque suggèrent une fréquence élevée de la lithiase vésicale de l'enfant, en particulier le garçon, dans les milieux défavorisés (Richet, 1995). En revanche, elles sont beaucoup moins nombreuses sur la lithiase de l'adulte qui semble affecter plutôt des aristocrates ou des notables et s'accompagne fréquemment de goutte (Wollaston, 1767). Bien que l'oxalate de calcium ait été identifié dans les calculs dès la fin du XVIIIe siècle, il n'apparaît pas comme un constituant majeur à cette époque où l'acide urique et ses sels ainsi que les phosphates calciques et magnésiens prédominent dans les calculs (Pearson, 1798).

Au milieu du XXe siècle, période où les données épidémiologiques commencent à être plus précises, on note, dans les pays non industrialisés ou au début de leur phase d'industrialisation, – situation correspondant à celle observée en Europe au XIXesiècle –, que la lithiase des populations de faible niveau socioéconomique est fréquente et affecte surtout les enfants avec une très forte prédominance masculine, le rapport garçons/filles étant parfois supérieur à 20 (Asper, R., 1984). Les calculs sont surtout de localisation vésicale. Leur composition, qui traduit à la fois une hygiène précaire et une alimentation essentiellement à base de céréales et de végétaux, souvent carencée en phosphore et en protéines animales, se caractérise par la prépondérance de l'urate d'ammonium et des phosphates calciques et magnésiens.

À l'inverse, la lithiase des populations de niveau de vie élevé, évoluant dans de meilleures conditions sanitaires et bénéficiant d'un régime alimentaire plus diversifié et

souvent riche en protéines animales, se traduit par des caractéristiques épidémiologiques très différentes : la lithiase affecte essentiellement l'adulte, de la 3^e à la 6^e décennie ; les calculs sont de localisation rénale et l'oxalate de calcium en est souvent le constituant majoritaire (Asper, 1984 ; Leusmann *et al*, 1990 ; Daudon, M *et al*, 1995).

De plus, le rapport hommes/femmes de la population lithiasique a considérablement diminué, se situant, selon les études, entre 1 et 2,8. Entre ces deux groupes, les populations de niveau économique modeste mais intermédiaire sont relativement moins exposées au risque de lithiase urinaire sauf si des facteurs particuliers (consanguinité, climat,.. etc.) ne les prédisposent à cette affection.

Dans les pays en développement où des données épidémiologiques successives sont disponibles, on note l'augmentation de prévalence de la lithiase rénale de l'adulte et la diminution de la prévalence de la lithiase vésicale infantile (Aspe, 1984). Une telle évolution traduit une élévation progressive du niveau de vie des populations. À la fin du XX^e siècle, même dans les pays en développement, la lithiase urinaire est de plus en plus souvent rénale et majoritaire en oxalate de calcium, y compris chez l'enfant (Daudon *et al*, 2004). Des études récentes réalisées au niveau des pays de la région du Maghreb ont montré une évolution de la lithiase de l'arbre urinaire vers celle des pays industrialisés où la fréquence de la lithiase rénale continue à augmenter et la prépondérance de l'oxalate de calcium est de plus en plus marquée (Hesse *et al*, 2003 ; Daudon, 2004 ; Bouslama *et al*, 2015).

I.3. Prévalence et incidence de la lithiase de l'arbre urinaire

La lithiase urinaire est une pathologie fréquente qui touche, selon les pays, de 4 à 20% de la population (Jungers, 1989). Plusieurs études épidémiologiques ont montré durant ces dernières décennies, que sa fréquence, en termes de prévalence et d'incidence, s'est accrue considérablement dans tous les pays industrialisés (Donsimoni *et al*, 1997 ; Oussama *et al*, 2000).

En Europe, les premières enquêtes de population ont été effectuées en Scandinavie dans les années 1970. Elles ont rapporté que 19 % des hommes de plus de 60 ans avaient des antécédents de lithiase urinaire (Ljunghall *et al*, 1987).

En Allemagne, une progression de 17 % de la prévalence de la lithiase a été observée entre l'enquête réalisée par Vahlensieck *et al*. au début des années 1980 (Vahlensieck *et al*, 1982) et celle de Hesse *et al*. conduite au début des années 2000 (Hesse *et al*, 2003).

En Italie, plusieurs études publiées au cours des 15 dernières années confirment aussi une progression de la lithiase, qui affecte aujourd'hui au moins 10 % de la population (Borghi *et al*, 1990 ; Trinchieri *et al*, 2000).

En Espagne, une étude publiée en 2001 (Alapont *et al*, 2001) a rapporté une incidence annuelle de 2,66 épisodes lithiasiques pour 1000 habitants et par an.

En France, l'étude SU.VI.MAX, débutée en 1994, (avait été précédée d'une enquête sur les antécédents médicaux des volontaires enrôlés dans l'étude) a montré que Les hommes étaient environ deux fois plus touchés que les femmes (13,6 % contre 7,6 %). L'âge au premier calcul était en moyenne de 30 ans chez la femme et de 35 ans chez l'homme. Le taux de récurrence était de 53 % et le nombre moyen de calculs était de trois par patient sans différence entre les sexes. Le délai entre deux récurrences était en moyenne de 3,5 ans.

Aux États-Unis, l'étude de Stamatelou *et al*. (2003) comparant les études de prévalence de la lithiase entre deux cohortes de sujets ayant répondu à un questionnaire de santé, la première entre 1976 et 1980 (cohorte NHANES II, $n = 25\ 286$ sujets) et la seconde entre 1988 et 1994 (cohorte NHANES III, $n = 33\ 994$ sujets), a montré une progression de la prévalence de la lithiase urinaire de 3,2 % dans la première période à 5,2 % pour la seconde, soit une augmentation de 62 %. La prévalence de la lithiase avait même doublé chez les sujets de 70 ans et plus, passant de 6,7 à 13,3 % chez l'homme et de 3,7 à 6,9 % chez les femmes entre les deux périodes (Daudon *et al*, 2008).

Dans les pays en développement, comme cela a été le cas pour les pays industrialisés depuis la fin de la 2ème guerre mondiale, la fréquence de la maladie lithiasique semble augmenter parallèlement avec l'augmentation du niveau de vie (Fournier *et al*, 1991).

I.4. Lithogénèse

La lithogénèse est l'ensemble des processus physicochimiques et biologiques qui conduisent, de la sursaturation des urines à la formation d'un calcul urinaire (Daudon, 1989 ; Daudon, 2013).

La genèse d'un calcul qui représente une agglomération de cristaux liés par une matrice organique (Khan *et al*, 1993 ; Ryall *et al*, 2005), comporte 7 phases qui s'expriment successivement ou simultanément (Daudon *et al*, 2008). (Voir Fig. 1)

I.4.1.Sursaturation urinaire

La sursaturation des urines est l'élément fondamental qui conditionne le risque de formation des cristaux. Elle traduit un excès de concentration d'une substance dissoute dans

l'urine par rapport aux capacités solvantes de celle-ci. Dans des conditions physicochimiques définies (température, pression, pH. . .), une substance peut être dissoute dans un solvant, en l'occurrence l'eau, jusqu'à une certaine concentration qui représente le produit de solubilité de cette substance dans le solvant (Daudon *et al*, 2008).

Lorsque la concentration de la substance égale à son produit de solubilité, on dit que la solution est saturée vis-à-vis de cette substance. Lorsque la concentration de la substance excède son produit de solubilité, la solution est sursaturée vis-à-vis de cette substance et des cristaux de celle-ci peuvent en principe se former (Boistelle, 1985 ; Daudon *et al*, 2008).

1.4.2. Germination ou nucléation cristalline

Lorsque le niveau de sursaturation est suffisant, les molécules dissoutes se rassemblent pour constituer des germes cristallins, premier stade des particules solides conduisant à la formation de calculs. On distingue deux sortes de nucléation:

- La nucléation homogène correspond à la cristallisation directe d'une espèce dont le niveau de sursaturation est élevé
- La nucléation hétérogène s'observe pour des niveaux de sursaturation moindres et traduit le fait que les cristaux se forment au contact de particules telles que des débris épithéliaux ou cellulaires ou d'autres cristaux préexistants, jouant le rôle d'inducteurs de cristallisation (Atmani *et al*, 1997 ; Daudon *et al*, 2000) ou de substrat et support de formation de nouvelles substances cristallines ou autres (trames de protéines, substances amorphes...)

1.4.3. Croissance cristalline

Les cristaux engendrés par une sursaturation élevée des urines sont initialement très petits (< 100 nm) et ne constituent donc pas une menace de lithiase. Ils vont ensuite grossir plus ou moins rapidement par captation de nouvelles molécules de la substance sursaturée présentes dans l'urine et former des particules plus grosses, comprises, selon les espèces cristallines et la composition urinaire, entre 1 et 100µm (Daudon, 2008).

1.4.4. Agrégation des cristaux

Contrairement à la croissance, l'agrégation cristalline est un phénomène qui peut être très rapide. Elle met en jeu les phénomènes d'attraction électrostatique en fonction de la charge superficielle des cristaux. De ce fait, l'agrégation peut engendrer des particules volumineuses ; dépassant parfois 200 µm, qui peuvent se former dans un délai très court, inférieur au temps de transit de l'urine à travers le rein (en moins de 1 minute) et par

conséquent être retenues dans les segments terminaux des néphrons, sur l'épithélium papillaire ou dans les cavités excrétrices du rein (Daudon, 2013).

1.4.5. Agglomération cristalline

L'agglomération des cristaux implique des macromolécules urinaires qui, par leurs nombreuses charges négatives, peuvent se fixer à la surface des cristaux et favoriser secondairement la fixation de nouveaux cristaux sur les premiers en les organisant les uns par rapport aux autres, contribuant ainsi à l'architecture du calcul (Daudon et al ; 2008).

1.4.6. Rétention des particules cristalline

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

1.4.7. Croissance et évolution du calcul

Au niveau de l'appareil urinaire, le calcul peut grossir en fixant de nouveaux cristaux ou en capturant de nouvelles molécules (calculogénèse) (Daudon, 2000 ; Marshall et al, 2007). Cette croissance qui dépend de l'environnement physico-chimique est plus au moins lente, un calcul de 10 mm de diamètre se formant sur une période allant de quelques mois jusqu'à 15 ou 20 ans selon le degré ou la pérennité de l'activité cristallogène de l'urine (Daudon et al, 1989).

La croissance n'est pas le seul mode d'évolution spontanée que subit un calcul retenu dans les voies urinaires. En effet, d'autres phénomènes peuvent se produire, qui vont conduire à des modifications de phases cristallines. Ils résultent de l'instabilité de certaines formes hydratées qui ont tendance à évoluer progressivement dans le temps vers des formes thermodynamiquement plus stables et moins hydratées (Daudon et al, 2012).

I.5. Promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation

Les urines sont un milieu de composition complexe et variable où de nombreuses substances peuvent être impliquées dans les processus de sursaturation et de cristallisation, les unes favorisant la formation des cristaux, les autres s'y opposant par divers mécanismes (Daudon, 2013).

Les ions qui participent à la formation des espèces insolubles sont appelés promoteurs de la cristallisation. Au nombre d'une dizaine, ils s'associent très souvent par deux ou par

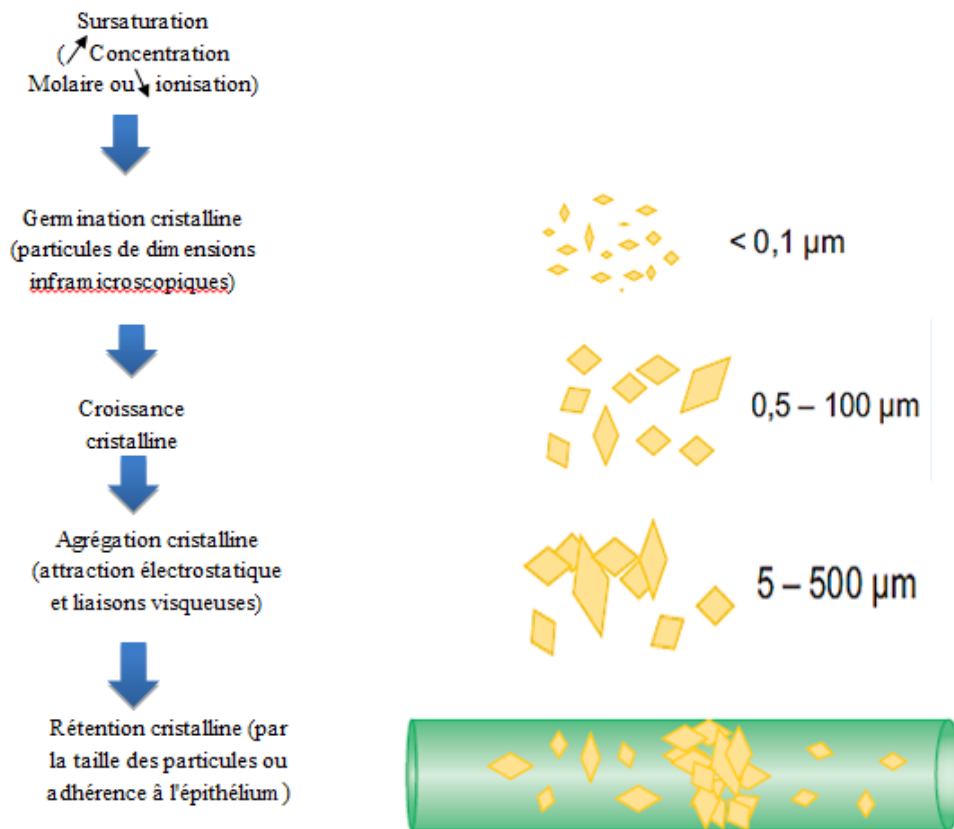


Figure 1 : Principales étapes de la lithogénèse (Daudon *et al*, 2012)

trois pour former une substance cristallisable qui, elle-même, peut se présenter sous plusieurs espèces cristallines (Fig. 2) (Daudon *et al*, 2008).

Pour s'opposer aux effets des promoteurs, de nombreux composés naturellement présents dans les urines, les inhibiteurs peuvent, selon leur nature, intervenir à toutes les étapes de la cristallogénèse (Fig. 3) (Daudon, 2013).

On distingue deux grandes catégories d'inhibiteurs selon leur mécanisme d'action (Daudon *et al*, 1994). La première correspond à des molécules capables de réduire la sursaturation en complexant l'un des ions qui entrent dans la composition des espèces cristallisables, tels que le calcium, l'oxalate ou le phosphate. Ces inhibiteurs sont des ions mono- ou polytomiques de faibles poids moléculaire, par exemple les ions citrate ou magnésium. Pour être efficaces, ils doivent être présents à des concentrations molaires élevées, du même ordre de grandeur que celles des ions qu'ils complexent (Daudon, 2013).

D'autres inhibiteurs sont connus pour agir directement sur les cristaux en occupant les sites de croissance situés à leur surface. Ces inhibiteurs qui peuvent être des ions de faible poids moléculaire comme les pyrophosphates ou, au contraire, des macromolécules filtrées

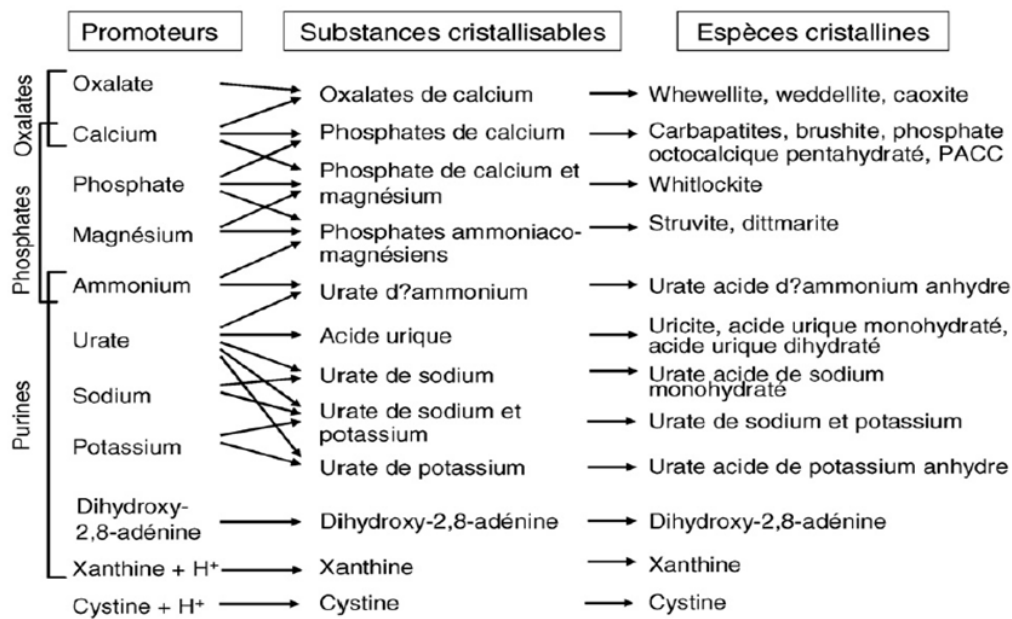


Figure 2 : Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines (Daudon et al, 2008)

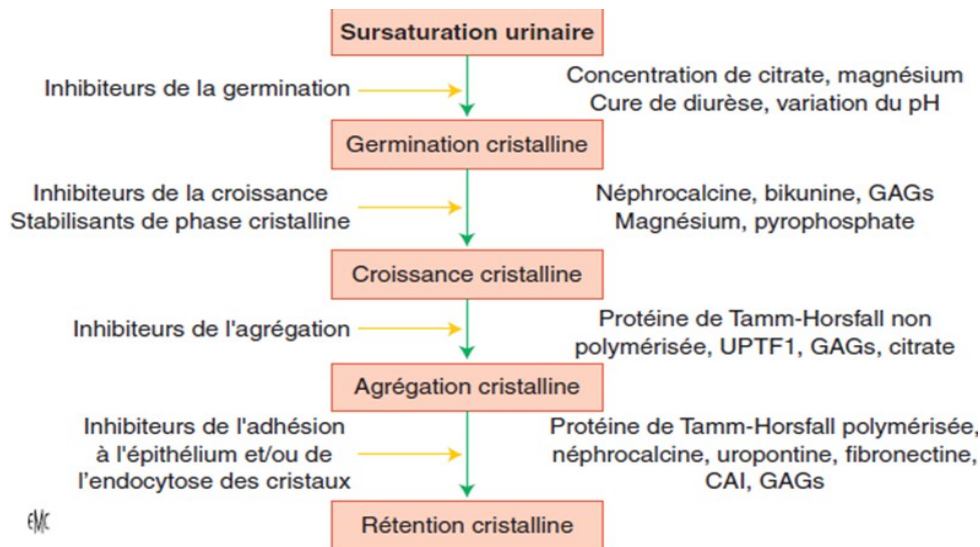


Figure 3 : Nature des mécanismes d'inhibition cristalline en regard des différentes étapes de la lithogénèse (Daudon, 2013)

CAL : Crystal Adhesion Inhibitor ; GAGs : Glycosaminoglycanes ; UPTF1 : Fragment 1 de la prothrombine (présent dans l'urine)

par les glomérules ou produites par l'épithélium tubulaire, sont actifs à des concentrations beaucoup plus faibles que les précédents.

Parmi les inhibiteurs macromoléculaire, certains ont la propriété de s'opposer à l'agrégation ou à l'adhérence des cristaux à l'épithélium (Wesson *et al.*, 1998). Ils appartiennent essentiellement à deux familles chimiques : les glycosaminoglycane (ex : les sulfates de chondroïtine, de dermatane et d'héparane, l'acide hyaluronique) et les glycoprotéines (ex : néphrocalcine, uropontine, bikunine, calprotectine, calgranuline, fragment 1 la prothrombine et THP) (Daudon, 2013).

I.6. Facteurs de risque de la lithiase urinaire

Outre les facteurs de risque spécifiques à chaque type de cristaux, il existe des facteurs de risque communs aux différents cristaux. Il s'agit de la concentration urinaire des solutés, la saturation urinaire et le pH urinaire.

Le défaut de boissons est la première cause de lithiase (Siener *et al.*, 2003). Un faible volume urinaire conduit à une augmentation de la concentration des solutés lithogènes, qui peut aggraver un déséquilibre entre promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation urinaire favorisé par les excès ou les désordres nutritionnels, situation particulièrement fréquente chez les sujets lithiasiques. Un temps de séjour de longue durée, des urines, dans les voies urinaires contribue à l'augmentation du risque de formation des cristaux (Daudon, 2005). Parmi les facteurs d'environnement, les variations saisonnières, les conditions climatiques et les habitudes alimentaires inadaptées ont une influence sur le risque lithogène.

A ces facteurs, s'ajoute les maladies héréditaires qui se manifestent le plus souvent dès l'enfance ou l'adolescence (Daudon, 2001).

I.7. Classification morpho-constitutionnelle et orientations étiologiques








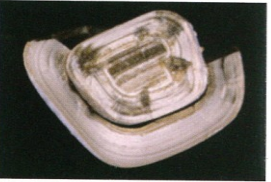


A l'origine, la classification des calculs urinaires a été établie en déterminant les espèces cristallines constitutives des calculs. Elle s'est attachée ensuite à établir des liens entre composition, structure et pathologie afin d'identifier les principaux facteurs lithogènes responsables de la formation d'un calcul donné.







Les études de Daudon *et al.* (2012) sur 45320 calculs urinaires, ont montré que la plupart des espèces cristallines pouvaient être reconnues par leur caractéristiques structurales et que l'organisation des cristaux ou des couches cristallines, pour une même phase, pouvait

orienter le diagnostic étiologique vers des pathologies ou des processus lithogènes particuliers.









De ces observations est née une classification morpho-constitutionnelle des calculs comportant sept types subdivisés en vingt-deux sous-types dont les principales caractéristiques sont résumés dans le Tableau 1 ([Daudon et al, 2012](#)).

Tableau 1 : Classification morpho-constitutionnelle des calculs urinaires selon [Daudon et al, 2012](#)











Caractéristiques structurales des calculs whewellite (type I)				
Sous type	Principale phase cristalline	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
Ia	Whewellite	Surface mamelonnée. Section faite de couches concentriques à cristallisation radiale. Couleur : brun ± foncé. Ombilication et plaque de Randall fréquentes		
Ib	Whewellite	Surface mamelonnée et rugueuse. Pas d'ombilication. Section inorganisée. Couleur : brun à brun foncé		
Ic	Whewellite	Surface bourgeonnante. Section finement granuleuse et peu organisée. Couleur claire, crème à brun-jaune clair		
Id	Whewellite	Surface lisse. Section faite de couches concentriques fines. Couleur : beige ou brun clair		
Ie	Whewellite	Surface localement bourgeonnante, mamelonnée ou rugueuse. Section : localement inorganisée ou à structure radiale. Couleur : brun-jaune clair à brun		
Caractéristiques structurales des calculs de weddellite (type II)				
Sous type	Principale phase	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES	SURFACE	SECTION

cristalline		MORPHOLOGIQUES		
IIa	Weddellite	Surface spiculée montrant des cristaux bipyramidaux agrégés avec des angles et des arêtes vifs. Section à cristallisation radiale lâche. Couleur : brun-jaune clair		
IIb	Weddellite	Surface spiculée faite de cristaux bipyramidaux épais aux angles et arêtes émoussés. Section cristalline inorganisée compacte. Couleur : brun-jaune clair à brun-jaune foncé		
IIc	Weddellite	Surface rugueuse. Section : inorganisée au centre avec une coque à structure concentrique diffuse en périphérie. Couleur : gris-beige à brun-jaune foncé		



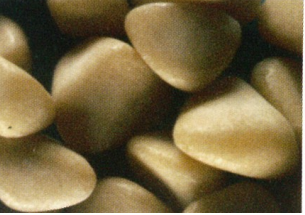

Caractéristiques structurales des calculs d'Acide urique ou d'autres (type III)

Sous type	Principale phase cristalline	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
IIIa	Acide urique anhydre	Surface homogène lisse. Section: structure concentrique avec une organisation cristalline radiale. Couleur: homogène, souvent orange, mais parfois crème. beige ou brun rouille		
IIIb	Acide urique dihydraté (± acide urique anhydre)	Surface bosselée, rugueuse et poreuse. Couleur hétérogène allant du beige au brun orangé. Section peu organisée avec des zones poreuses fréquentes. Couleur : orange		
IIIc	Ammonium Urate acide	Surface homogène, rugueuse et localement poreuse. Couleur beige à grisâtre. Section inorganisée poreuse. Couleur: blanchâtre à grisâtre		
IIId	Urate acide d'ammonium	Surface hétérogène. bosselée. rugueuse et poreuse. Couleur : grisâtre à brune. Section faite de couches alternées, épaisses et brunes ou fines et grêges, localement poreuses		




Caractéristiques structurales des calculs de Carbapatite (type IV)

Sous type	Principale phase cristalline	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
IVa ₁	Carbapatite	Surface rugueuse homogène. Section : peu organisée ou faite de couches concentriques diffuses. Couleur : blanchâtre à beige		
IVa ₂	Carbapatite	Surface bosselée et vernissée avec de fines craquelures. Aspect émaillé, vitrifié. Section faite de couches alternées, épaisses brun-jaune et fines beiges. Souvent noyaux multiples		
IVb	Carbapatite ± struvite	Surface hétérogène, bosselée et rugueuse. Couleur hétérogène, crème à brun foncé. Section faite de couches irrégulièrement alternées épaisses blanchâtres et fines brun-jaune		
IVc	Struvite	Surface homogène faite de cristaux agrégés aux angles et arêtes émoussés. Section : cristallisation radiale diffuse et lâche. Couleur : blanchâtre		
IVd	Brushite	Surface finement rugueuse ou pommelée. Section faite de couches concentriques à cristallisation radiale. Couleur : blanchâtre à beige		

Caractéristiques structurales des calculs de Cystine (type V)

Sous type	Principale phase cristalline	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
Va	Cystine	Surface rugueuse ou faite de petits cristaux empilés. Aspect cireux ou de bonbon au miel. Section : peu organisée. parfois organisation cristalline radiale diffuse. Couleur: jaunâtre		
Vb	Cystine	Surface lisse. Section : couches concentriques en périphérie, centre inorganisé. Couleur: crème à jaunâtre		

Caractéristiques structurales des calculs de Protéines (type VI)

Sous type	Principale phase cristalline	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE ET SECTION
VIa	Protéines	Calculs matriciels mous. Surface homogène. Section inorganisée. Couleur : crème a brun-jaune clair	
VIb	Protéines et médicaments ou composés métaboliques	Surface hétérogène irrégulièrement rugueuse, localement craquelée. Section : structure feuilletée grossière. Couleur : brun foncé à noir. Les autres corps souvent présents peuvent modifier la structure et la couleur	
VIc	Protéines et whewellite	Surface homogène, lisse, avec des &allies et des crevasses. Couleur brun foncé. Section faite (tune enveloppe protéique brun foncé entourant un centre inorganisé clair contenant un mélange de cristaux de whewellite et de protéines	

II. Lithiase d'oxalate de calcium

II.1. Calcium, oxalate et lithiase oxalocalcique

Les oxalates de calcium, de formule $[CaC_2O_4 \cdot nH_2O]$ avec $n = 1, 2, 3$, sont largement décrits comme étant les principales composantes inorganiques des calcifications pathologiques. Dans le corps humain, ces phases cristallines sont issues de la précipitation des ions oxalates avec des cations Ca^{2+} du fait notamment de la sursaturation de ces espèces ioniques ou d'un changement « brutal » de pH. Celle-ci se déroule presque exclusivement au niveau des reins, majoritairement dans les tubules collecteurs et le bassinet puis donne naissance aux calculs rénaux (Daudon *et al*, 2012).

L'oxalate ou acide oxalique (COOH-COOH, PM 90dalton) est le produit terminal du métabolisme dont la principale voie d'excrétion est le rein (Caquet, 2015). Une faible part de l'oxalate provient des apports alimentaires (10%) et l'essentiel est issu du métabolisme endogène (90%). L'oxalate d'origine exogène est présent en concentration élevée dans certains aliments tels que le cacao, le chocolat, le thé longuement infusé, les épinards, les baies rouges,... etc (voir Tableau 2). L'absorption intestinales se fait à tous les niveaux selon un mécanisme de diffusion facilitée par un échange anionique (CL-, OH-) (Ben ammar *et al*, 1993). Seule une faible fraction alimentaire (2 à 5%) est absorbée (Archer *et al*, 1957 ; Jungers *et al*, 1989), la majorité d'entre eux étant éliminée par les bactéries intestinales en tant que source d'énergie ou dans les fèces sous forme d'oxalate de calcium. Pour ce qui est de l'oxalate d'origine endogène, environ 35 à 55% (10 à 20 mg de l'oxalate urinaire) proviennent du catabolisme irréversible de l'acide ascorbique et 50 à 70% de l'oxydation irréversible du glyoxylate qui dérive lui-même du métabolisme de la glycine, de l'acide glycolique, de la sérine (Fig. 4). Enfin, une part mineure est liée au métabolisme du tryptophane, de la phénylalanine, de la tyrosine, de l'acide aspartique et des purines (Traxer *et al*, 2003).

L'acide oxalique est un déchet non utilisable par l'organisme et est éliminé à 90% dans les urines sous forme inchangée – son taux varie de 10 à 50 mg/j (100 - 500 umol/j). Cette élimination se fait par filtration glomérulaire qui est totale en raison de la très faible liaison protéique et par sécrétion tubulaire qui se fait au niveau du tube proximal alors qu'il existe une réabsorption moindre par diffusion passive.

Tableau 2: Teneur en oxalate (en mg/100g) de quelques aliments (Daudon, 2005)

Aliments	Teneur en mg/100g
Betterave rouge	180
Coriandre	180
poivre	200
Chocolat noir	400
Epinards	440
Rhubarbe	460
Cacao	470
oseille	>500

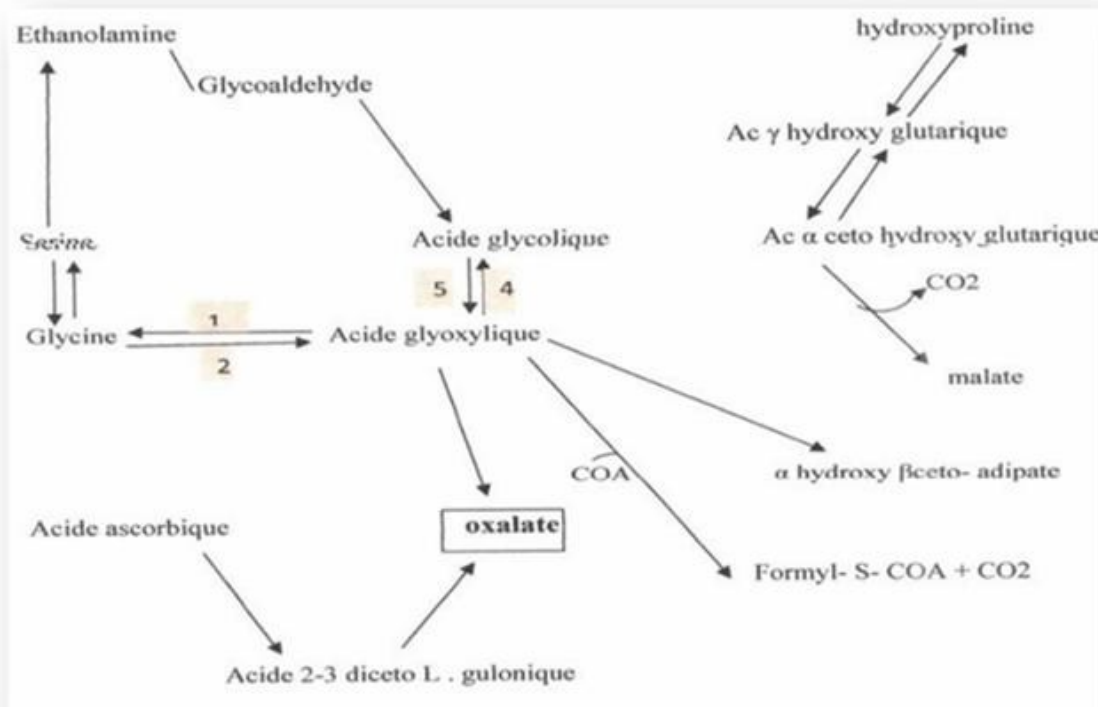


Figure 4: Métabolisme de l'acide oxalique chez l'homme (Huber et al, 2005)

1 - AGT : Alanine glyoxylate aminotransférase, 2 - Glycine oxydase ou D amino acide oxydase ; 3 - α Cetoglutarate glyoxylate carboligase (Mg, vitamine B1), 4 - Glyoxylate reductase 5 - Glycolate oxydase 6 - CoA : Péroxydase

Pour ce qui est du calcium, il est à 99 % contenu dans le squelette, alors que 1% se situe dans les espaces extra et intracellulaires. A une concentration normale de 2.5 mmole par litre de plasma, environ 45% du calcium est sous forme libre, 45 % sont liés à des protéines plasmatiques (85% du calcium lié à l'albumine, 15% à diverses globulines) et les 10 %

restants sont liés à des bicarbonates, des citrates, des lactates et des phosphates. Contrairement aux oxalates, les aliments (Tableau 3) représentent la seule source de calcium pour l'organisme (Mundy et Martin, 1993 ; Cioppi *et al*, 2009), dont 20 à 30% du calcium ingéré est absorbé selon un mécanisme de transport actif dépendant du calcitriol et un mécanisme de diffusion facilitée dépendant de l'apport. L'élimination s'effectue avant tout par l'intestin puis les reins où la quasi-totalité (~98%) du calcium filtré est réabsorbée par le tubule rénal et plusieurs segments du néphron sont concernés (Horn et Sternberg, 2005). Dans le tubule proximal, cette réabsorption est paracellulaire et couplée à celle du sodium et de l'eau. Dans l'anse de Henle, la réabsorption du calcium se fait par liaison à une protéine spécifique, la paracelline. Alors que dans le tube contourné distal, la réabsorption du calcium est au moins partiellement active. Elle est modulée par les hormones calciotropes, calcitriol, PTH et calcitonine (Déchaux, 2011).

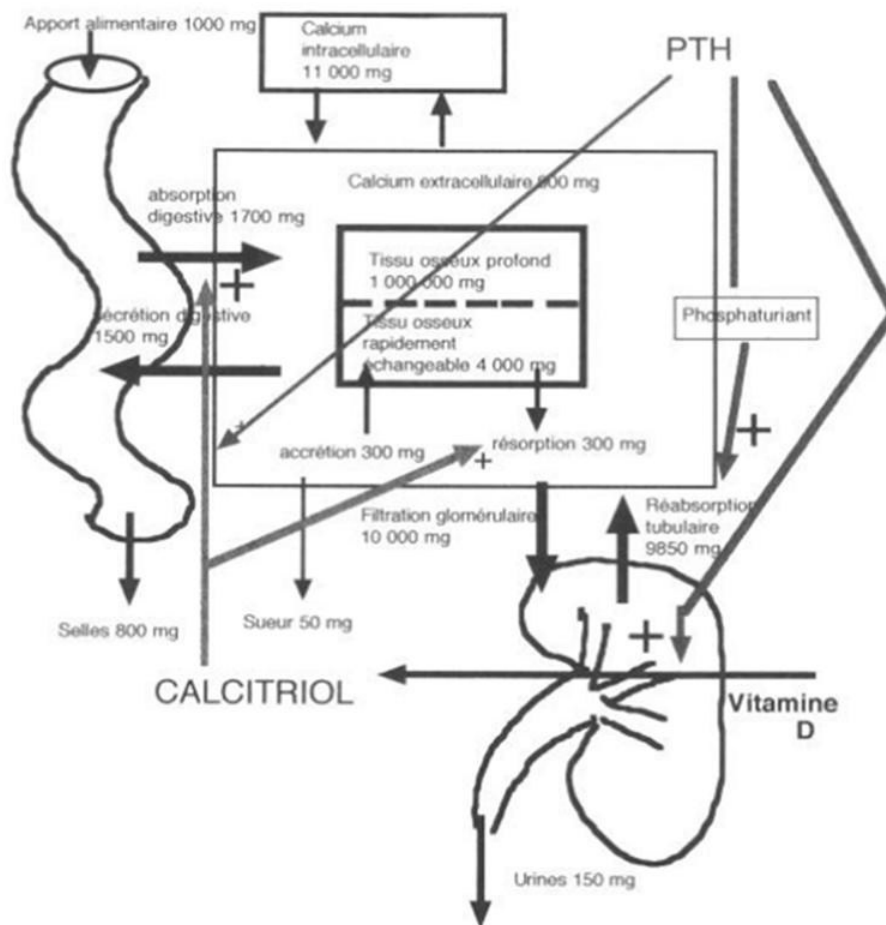


Figure 5 : Métabolisme du calcium (Deyris *et al*, 2000)

Tableau 3 : Teneur en calcium des produits laitiers et de quelques aliments (Daudon, 2005)

Aliments	Teneur en g/kg
Produits laitiers	
Lait de vache	120
Lait de brebis	180
Yaourts	130
Fromages	
Fromage blanc	100
Munster	300
Brie	400
Camembert	500
Bleu de Bresse	500
Roquefort	660
Edam	800
Gouda	800
Gruyère	1000
Emmental	1000
Parmesan	1200
Légumes	
Chou vert	210
Persil	245
Pois cassés secs	530
Fruits et akènes	
Dattes sèches	65
Figues sèches	190
Noisettes	225
Amandes douces	250
Graines de sésame	780

II.2. Les différents types de calculs oxalocalciques

L'oxalate de calcium se divise en trois phases cristallographiques distinctes :

- **Whewellite (Oxalate de calcium monohydraté, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)**: est plus dense, moins friables, de couleur marron ou couleur noire, lisse et dur. Sa formation est favorisée par des concentrations élevées d'oxalates urinaires (Traxer, O, 2007 ; Hesse et al, 2009).
- **Weddellite (Oxalate de calcium dihydraté, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)** : moins radio-opaque, plus friable, de couleur jaune et spiculé (Traxer, O, 2007). C'est un type calcium dépendant.
- **Caoxite (oxalate de calcium trihydraté, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)** : Il s'agit d'une forme très instable qui se convertit en whewellite en quelques heures à 37°C et qui, dans l'urine, serait inhibée par des macromolécules (Gardner et al, 1978). Cependant, dans certains

contextes pathologiques, l'oxalate de calcium trihydraté cristallise et semble même stabilisé pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, aussi bien dans les urines que dans les calculs (Daudon *et al*, 1987). Cette phase n'est que très peu référencée car extrêmement rare (Nindiyasari *et al*, 2014).

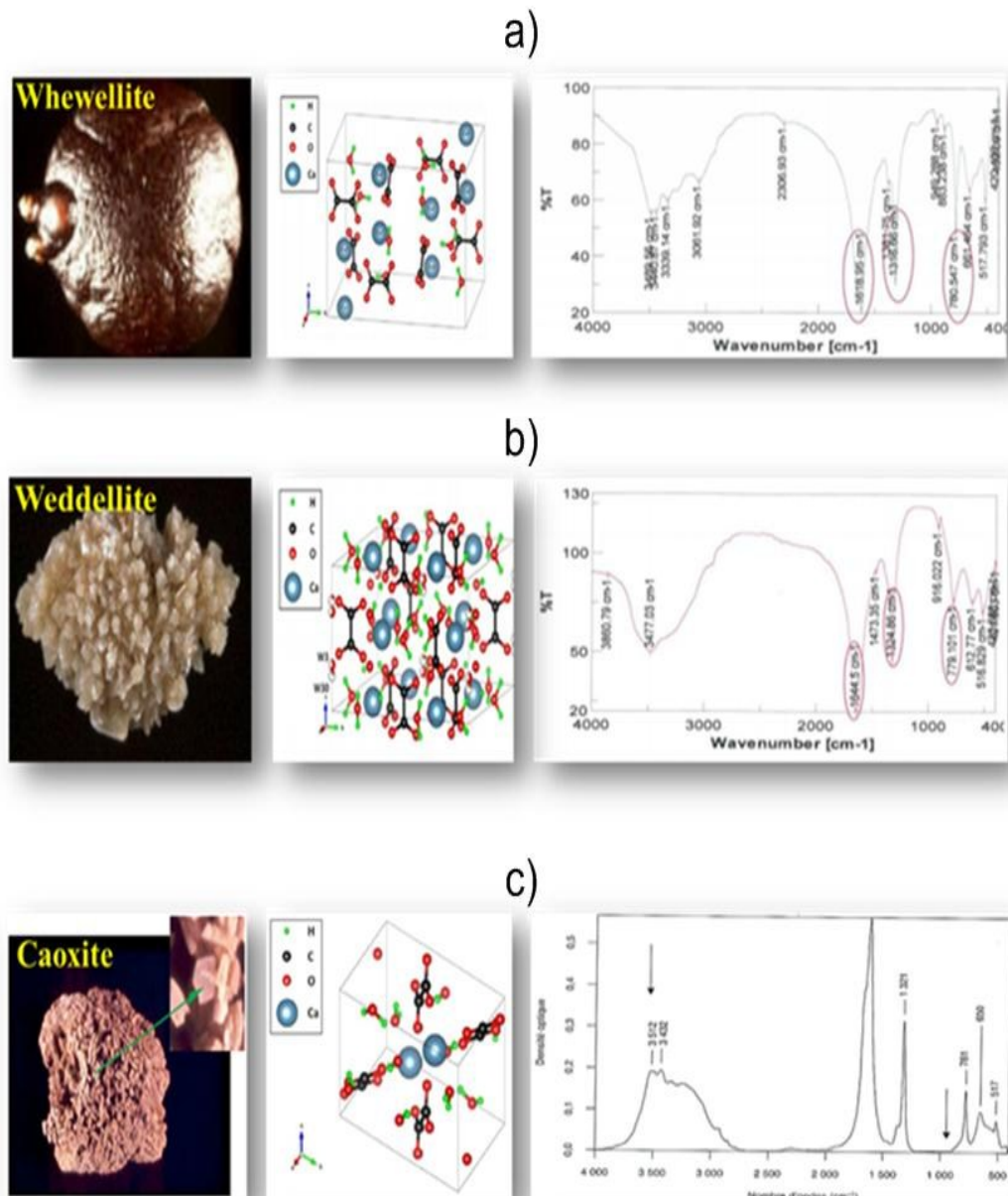


Figure 6 : Aspect macroscopique, spectrophotométrie infrarouge et représentation de la structure cristalline de la whewellite (COM), weddellite (COD) et caoxite (COT).
(Tazzoli *et al*, 1980 ; Deganello *et al*, 1981 ; Hochrein *et al*, 2008)

II.3. Causes principales de lithiase oxalocalcique

Multifactorielle par excellence, la lithiase oxalocalcique dépend à la fois de facteurs prédisposant, probablement génétiques, de facteurs nutritionnels, et de leurs interactions (Jungers *et al*, 1989 ; Jungers *et al*, 1993 ; Graf *et al*, 2000). Les principales causes de lithiases oxalocalciques sont résumées dans le Tableau 4.

Tableau 4: Principales causes de lithiases oxalocalciques (Daudon *et al*, 2011)

Avec hypercalcémie	Hyperparathyroïdie primaire Sarcoïdose et autres granulomatoses Surdosage en vitamine D Myélome multiple, métastases osseuses, maladies de Paget Hyperthyroïdie Traitement prolongé par les sels de lithium (hyperparathyroïdie)
Avec hypercalciurie sans hypercalcémie	Hypercalciurie idiopathique Apports calciques excessifs Maladie de Cacchi et Ricci Excès d'apports en protéines animales et/ou en sel Tubulopathies congénitales Causes médicamenteuses <ul style="list-style-type: none"> - Supplémentations vitaminocalciques inadaptées - Corticoïdes
Avec hyperoxalurie	Hyperoxaluries primaires Hyperoxalurie entérique : maladies inflammatoires digestives, résections du grêle, irradiations pelviennes (grêle radique) Chirurgie bariatrique pour obésité Mucoviscidose Consommation excessive d'aliments riches en oxalate Diabète de type 2 Apports calciques insuffisants
Avec diurèse insuffisante	Lithiase calcique commune Travail en atmosphère surchauffée (cuisiniers, fondeurs) Séjour prolongé en pays chauds Contraintes professionnelles (chauffeurs de taxi)

II.3.1. Etiologies de l'hyperoxalurie

L'hyperoxalurie se définit par une excrétion urinaire d'oxalate supérieure à 40 mg/jour. Elle est associée à la formation de calculs d'oxalate de calcium monohydraté (C1) et est donc un facteur de risque majeur pour cette pathologie. Différents types d'hyperoxalurie peuvent être distingués:

II.3.1.1. L'hyperoxalurie entérique

Ce type d'hyperoxalurie est le désordre le plus fréquent et résulte d'une malabsorption des graisses. Les graisses non absorbées se lient au calcium, empêchant la formation des complexes calcium-oxalate intestinaux non absorbables, favorisant une absorption excessive d'oxalates libres au niveau colique. Un autre mécanisme peut être responsable d'une hyperabsorption digestive d'oxalate : les bactéries dégradant l'oxalate à l'intérieur du tube digestif telles qu'*Oxalobacter formigenes* peuvent être détruites par les antibiothérapies itératives (Courbebaïsse et al, 2016). En fin, un apport trop faible en calcium, inférieur à 600 mg/24 h, stimule par lui-même l'absorption intestinale de l'oxalate et tend à augmenter l'oxalurie.

II.3.1.2. L'hyperoxalurie diététique

Elle résulte d'un excès d'apport d'oxalates alimentaires (rhubarbe, chocolat, épinard...), ou d'une ingestion massive d'éthylène glycol ou d'acide ascorbique, ces deux derniers étant métabolisés en acide oxalique (Muji et al, 2015).

II.3.1.3. L'hyperoxalurie primaire

L'hyperoxalurie primitive (ou « oxalose ») est une maladie génétique, liée à des déficits autosomaux, récessifs, enzymatiques du métabolisme du glyoxylate, survient chez des enfants et adultes jeunes (Cochat et al, 2013). Il en résulte un défaut de dégradation du glyoxylate qui est transformé en oxalate s'accumulant dans l'urine. Il existe trois formes de la maladie qui sont associées à des mutations dans trois gènes différents :

- ***L'hyperoxalurie primaire de type 1 (PH1)*** est causée par des mutations dans le gène AGXT (localisé sur le chromosome 2 en 2q37.3.) qui code pour une enzyme hépatique, l'alanineglyoxylate-aminotransférase. Cette enzyme dont le co-enzyme est la vitamine B6, convertit le glyoxylate en glycine. En son absence, le glyoxylate est transformé en oxalate qui s'accumule sous forme calcique insoluble dans les reins et d'autres organes (Daudon et al, 2008 ; Ferraro et al, 2012 ; Osther, 2012).

- *L'hyperoxalurie primaire de type 2 (PH2)* est causée par des mutations dans le gène GRHPR situé sur le chromosome 9p13.2, codant pour la glyoxylate réductase/hydroxypyruvate reductase (Cramer et al, 1999). Comme dans le cas de PH1, une altération de la voie métabolique du glyoxylate peut conduire à l'accumulation de cette substance, sa conversion en oxalate et donc à une hyperoxalurie.
- *L'hyperoxalurie primaire de type 3 (HP3)*, une autre forme d'hyperoxalurie primaire "non PH1 / PH2" a été décrite, qui est causée par des mutations du gène HOGA1, codant pour une enzyme mitochondriale (4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1), est localisé sur le chromosome 10q24.2 (Belostotsky et al, 2010). L'enzyme est exprimée au niveau du foie et des reins (Williams et al, 2012). Son inactivité entraîne une accumulation de 4-hydroxy-2-oxoglutarate qui inhibe l'activité de la glyoxylate réductase, ce qui a les mêmes conséquences qu'une HP de type 2 (Bouzidi et al, 2016).

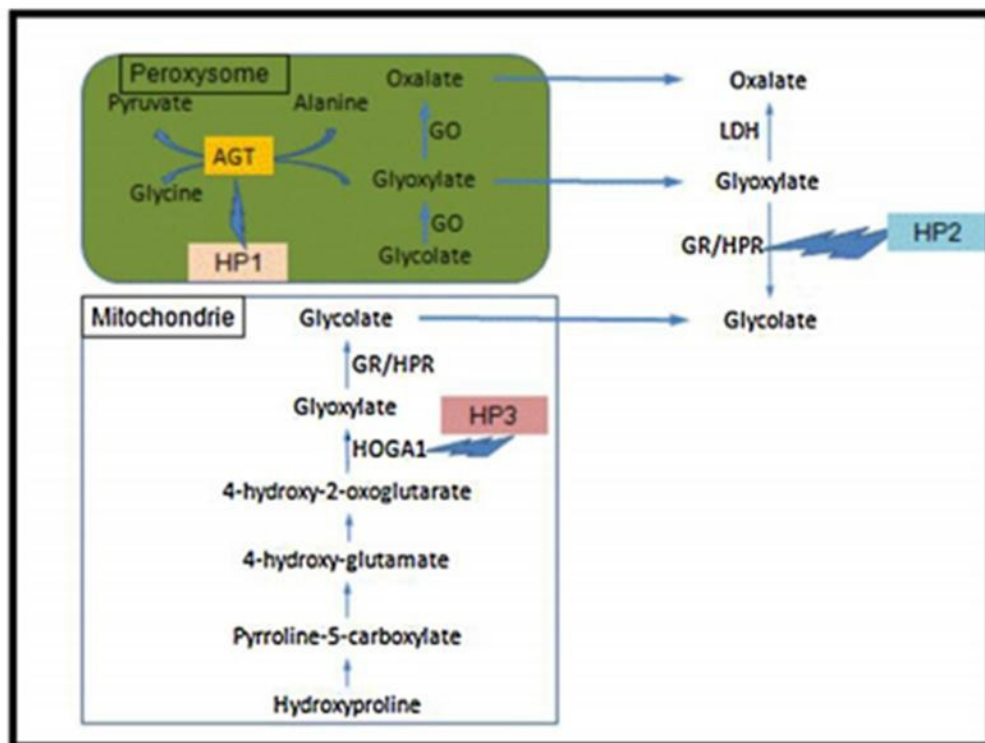


Figure 7. Voies métaboliques conduisant à la surproduction d'oxalate dans les hyperoxaluries primaires de types 1 (HP1), 2 (HP2) et 3 (HP3) (Bouzidi et al, 2016)

AGT : alanine glyoxylate aminotransférase ; GR/HPR : glyoxylate réductase/hydroxypyruvate réductase ; GO : glycolate oxidase ; HOGA1 : 4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1 ; LDH : lactate déshydrogénase.

II.3.2. Etiologies de l'hypercalciurie

C'est une anomalie métabolique fréquente définie par une excrétion urinaire de calcium supérieure à 4 mg/kg par 24 heures. Elle est parfois secondaire à une condition pathologique (hyperparathyroïdie, surdosage en vitamine D, sarcoïdose, cancer, immobilisation, carence estrogénique), selon qu'elles s'associent ou non à une hypercalcémie ou à une hyperoxalurie (Tableau 4), mais le plus souvent idiopathique, qui est une des conditions les plus fréquemment observées dans la lithiase calcique primitive (Tasca et al, 2009 ; Boulanger et Flamant, 2013).

L'hypercalciurie idiopathique est en effet observée chez plus de la moitié des patients lithiasiques et constitue un des principaux facteurs étiologiques de la lithiase rénale oxalocalcique (Kuntz et de Vernejoul, 2000), sachant que le caractère idiopathique est affirmé par les données cliniques et biologiques (Déchaux, 2011).

Pak. (1980) a mis une classification de l'hypercalciurie idiopathique en fonction de plusieurs mécanismes physiopathologiques qu'il propose et on distingue :

II.3.2.1. L'hypercalciurie liée aux facteurs alimentaires (type 1 de Pak)

La calciurie est influencée par la richesse du régime alimentaire en calcium, sodium, protéines, hydrates de carbone, alcool, et phosphate.

II.3.2.2. L'hypercalciurie d'absorption (type 2 de Pak)

Dans l'hypercalciurie par hyperabsorption intestinale de calcium deux mécanismes sont proposés :

- dans le premier l'hyperabsorption intestinale du calcium est dite primitive. L'élévation de la calcémie qui en résulte est corrigée du fait de la freination de la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (PTH). Le taux sérique de PTH doit donc en principe être normal ou bas.
- Dans le deuxième mécanisme, l'hyperabsorption intestinale du calcium serait secondaire à une fuite rénale du phosphore. L'hypophosphorémie qui en résulte stimulerait l'activité de la 1 alpha hydroxylase des cellules tubulaires rénales avec synthèse accrue de la calcitriol qui stimule à son tour l'absorption intestinale du calcium, la majoration de la calcémie étant corrigée simultanément par l'augmentation de l'excrétion rénale du calcium (Kuntz et de Vernejoul, 2000).

II.3.2.3. L'hypercalciurie par fuite rénale du calcium (type III de Pak)

Dans ce type d'hypercalciurie, il y a une diminution primitive de la réabsorption tubulaire du calcium qui induit une hypocalcémie cette fois immédiatement corrigée par l'augmentation de la sécrétion de PTH qui augmente elle-même la synthèse de calcitriol et finalement l'absorption intestinale du calcium (Kuntz et de Vernejoul, 2000).

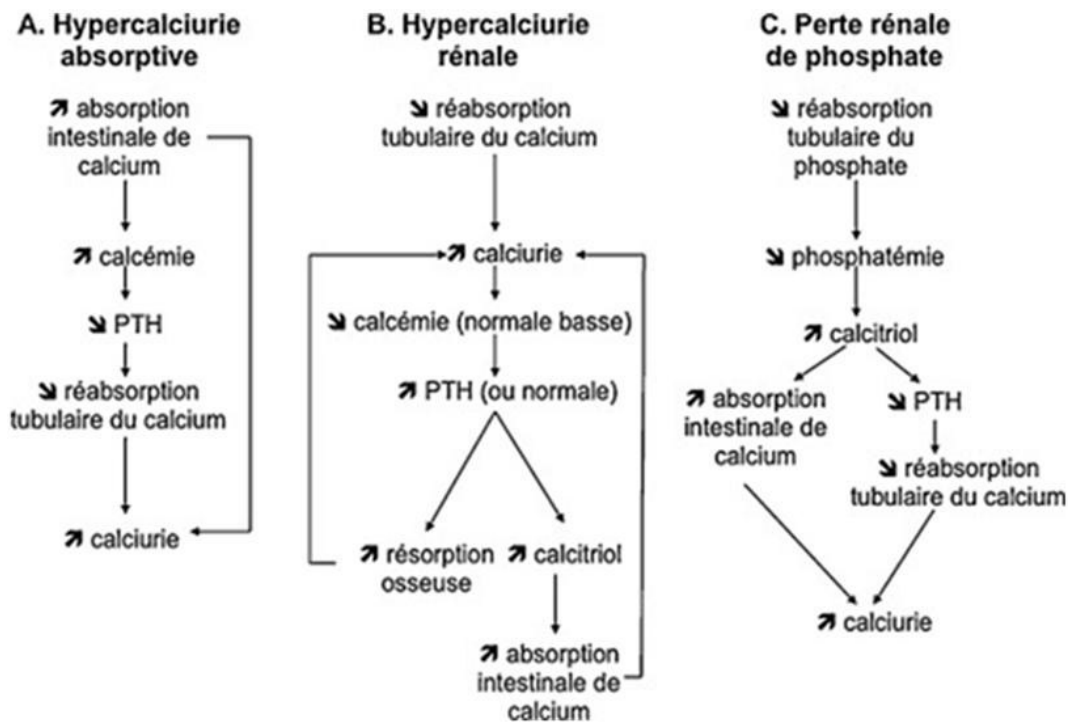


Figure 8 : Interprétation du test de charge orale en calcium (test de Pak-Broadus) (Courbebaisse et al, 2016)

Il est important de se souvenir qu'une diurèse insuffisante est la principale cause d'augmentation de concentration du calcium et de l'oxalate urinaire. Un volume de diurèse inférieur à 2 l/j doit être tenu pour insuffisant chez tout lithiasique. De plus, une concentration élevée des urines en acide urique favorise également la précipitation des cristaux d'oxalate de calcium. Enfin, une hypocitraturie modérée est fréquente, en notant qu'un apport élevé en protéines animales, par la charge acide qu'il entraîne, tend par lui-même à diminuer la citraturie (Jungers et al, 1999 ; Jungers, 2003 ; Susiki et al, 2008).

II.4. Relation entre type morphologique des calculs oxalocalciques et pathologies associées

La morphologie des calculs est essentielle pour établir les relations entre les facteurs biochimiques impliqués dans le processus lithogène et les causes du calcul.

II.4.1. Pour la whewellite

- **Type Ia** : correspond à des hyperoxaluries intermittentes, essentiellement nutritionnelles ou par défaut de diurèse (hyperoxalurie de concentration).
- **Type Ib** : s'observe dans le cas d'hyperoxalurie, stase et de conversion cristallines.
- **Type Ic** : correspond essentiellement à des hyperoxaluries d'origine génétique (hyperoxalurie primitive de type I, II et non I-non II) (Daudon *et al*, 1998).
- **Type Id** : traduit les situations de stase avec confinement anatomique (obstruction, anomalies anatomiques post-papillaires).
- **Type I actif** : s'observe surtout dans les hyperoxaluries absorbatives des pathologies digestives inflammatoire avec stéatorrhée (Cohen-Solal *et al*, 2001).
- La présence d'une ombilication papillaire et d'un dépôt phosphocalcique à l'intérieur de l'ombilication témoigne d'un processus lithogène par nucléation hétérogène sur plaque de Randall dont son origine pourrait être liée à une hypercalciurie ancienne (diététique ou thérapeutique) (Cifuentes-Delatte *et al*, 1987 ; Evan *et al*, 2003).

II.4.2. Pour la weddellite

- **Type IIa** : correspond à des hypercalciuries de toutes origines, de débit ou de concentration.
- **Type IIb** : est associé à des anomalies souvent multiples : hypercalciurie + hyperoxalurie + hypocitraturie.
- **Type IIc** : s'observe dans les hypercalciuries, confinement anatomique, stase et lithiase multiple.
- **Le type Ia + IIb** où la présence de whewellite majoritaire sous forme de type Ia résulte essentiellement, voir exclusivement d'une conversion cristalline est souvent la conséquence d'une hypercalciurie ancienne (nutritionnelle dans bien des cas), avec conversion secondaire de weddellite en whewellite sans qu'il y ait d'hyperoxalurie associée.

- En présence de grosses lames quadratiques (> 2.5mm de côté), l'hypercalciurie, qui est le principal déterminant des calculs de type II, s'accompagne fréquemment d'une hyperoxalurie, mais aussi d'une hypocitraturie (Daudon *et al*, 2003).

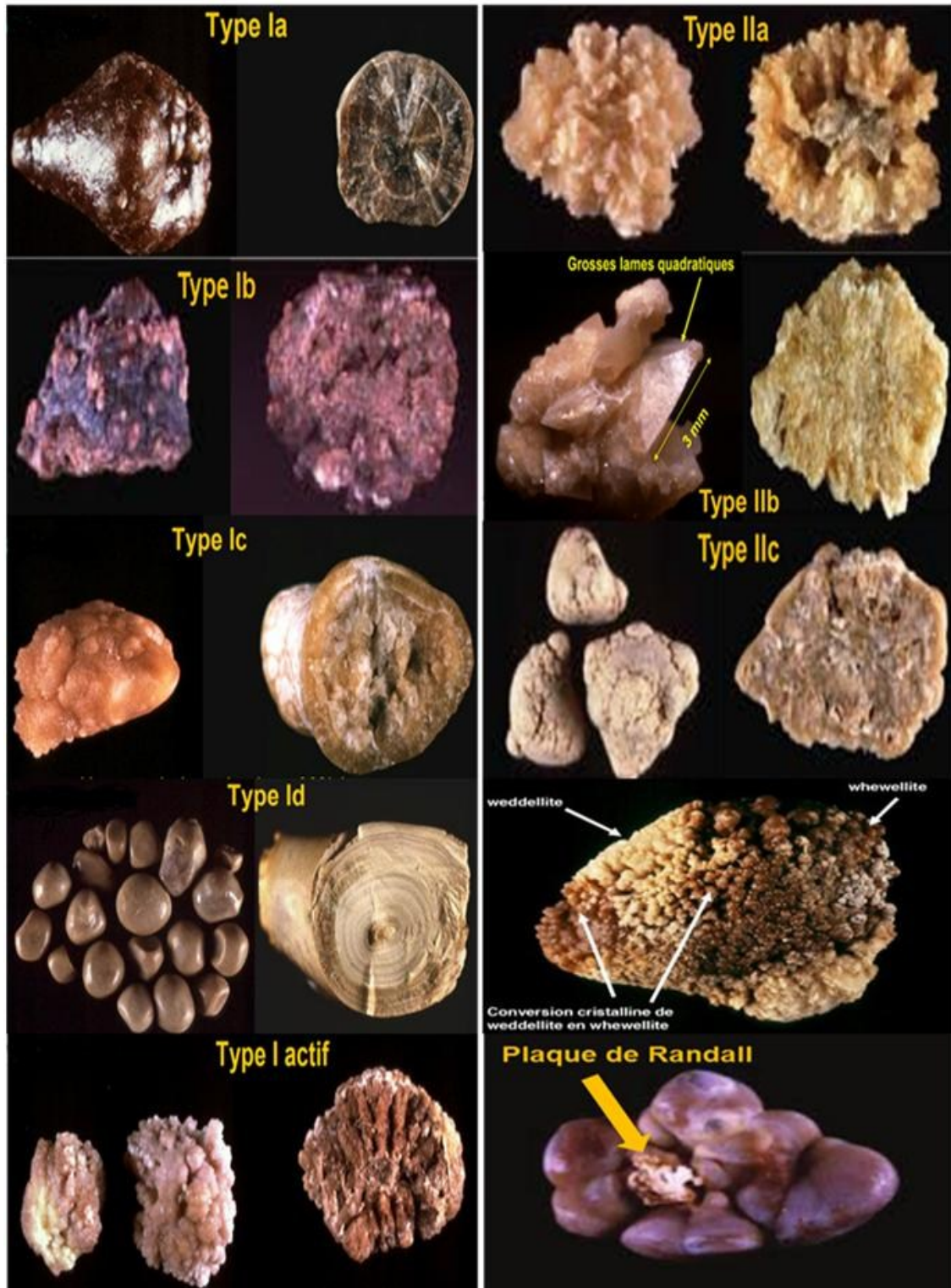


Figure 9: Types morphologiques des calculs oxalocalciques (Daudon *et al*, 2003)

II.5. Les cristaux d'oxalate de calcium

L'urine est un liquide avec une composition complexe qui influence la cristallisation. La présence de cristaux dans les urines n'est pas nécessairement pathologique du moment que de nombreux sujets présentent à un moment ou à un autre des cristaux dans leurs urines en fonction de leur alimentation et de leurs apports hydriques qui peuvent varier considérablement d'un sujet à l'autre et d'un jour à l'autre chez un même individu. Cependant, cette cristallisation témoigne d'une sursaturation de l'urine et d'une rupture d'équilibre entre deux catégories de substances: les promoteurs et les inhibiteurs de la cristallisation ce qui représente une des premières étapes de la lithogenèse tandis que chez le patient lithiasique, c'est un risque important de récurrence ([Daudon et al, 2003](#) ; [Daudon et al, 2004](#) ; [Gadisseur, 2012](#)).

Les deux principaux déterminants de la sursaturation conduisant à la formation de cristaux sont l'excès de concentration molaire de certains ions et le pH de l'urine. Certaines espèces cristallines sont relativement peu sensibles aux variations naturelles du pH urinaire, alors que d'autres sont très dépendantes de celui-ci. Pour les cristaux d'oxalate de calcium, ce sont des espèces indépendantes du pH où la cristallisation est déterminée essentiellement par leur concentration molaire excessive dans l'urine (Tableau 5).

Tableau 5 : Sensibilité au pH et pH moyen d'observation des espèces cristallines oxalocalciques ([Daudon, 2015](#))

Espèce cristalline	Sensibilité au pH urinaire	pH moyen (domaine de pH habituel de formation)
whewellite	Faible	5.9 (4.8–7.5)
weddellite	Faible	5.8 (4.8–7.5)
caoxite	Faible	5.8 (5.2–6.0)

La même substance cristallise souvent dans des formes différentes dépendant de la concentration et de la composition de l'urine. Microscopiquement, les cristaux d'oxalate de calcium monohydraté ont une forme ovale particulière qui présente une dépression au centre et des extrémités renflées (Fig. 10 A). Les cristaux d'oxalate de calcium dihydratés sont formés de deux pyramides aplaties et accolées par leur base. Ils sont comparables à de petites enveloppes claires, octaédriques, en croix de Malte (Fig. 10 D). Concernant les cristaux de la caoxite (oxalate de calcium trihydraté), ils ont une forme hexagonale (Fig. 10 G).

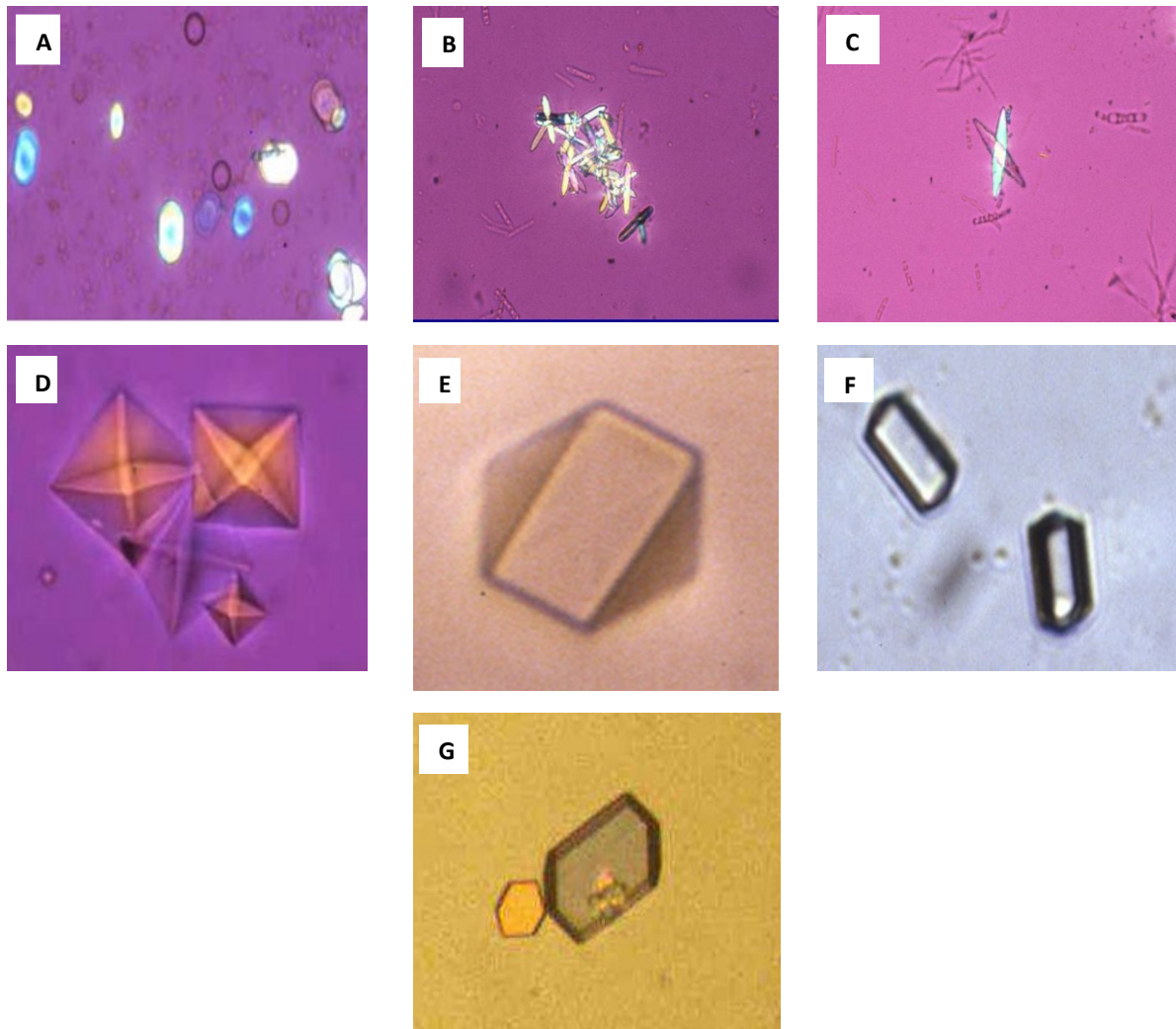


Figure 10 : Cristaux d'oxalate de calcium vus au microscope optique à polarisation (Daudon, 2015)

(A) Cristaux ovales de whewellite, (B) Cristaux de whewellite en hexagones allongés, (C) Cristaux de whewellite en navettes étirées, (D) Cristaux octaédriques de weddellite, (E) Cristaux dodécaédriques de weddellite, (F) Forme dodécaédrique très allongée de weddellite, (G) Cristal hexagonal de coxite.

Ces espèces cristallines peuvent être détectées dans les urines, sous différents faciès, fournissant très souvent des informations utiles. Ainsi, par exemple, la weddellite cristallise classiquement sous forme octaédrique mais la présence de formes dodécaédriques (épaississement de la zone de contact entre les deux pyramides) indique une forte hypercalciurie (Fig. 10 E, F). Dans le cas de la whewellite, le faciès en hexagones et en navette étirés (Fig. 10 B, C) est un marqueur des hyperoxaluries avec acidose métabolique induite par les intoxications par l'éthylène glycol. La présence de cristaux de coxite oriente vers une hyperoxalurie associée à une anomalie des inhibiteurs macromoléculaires urinaires.

Le nombre et la taille des cristaux eux-mêmes fournissent certaines informations utiles. Ainsi, par exemple, un nombre supérieur à 500 cristaux de whewellite par mm^3 suggère une hyperoxalurie primaire tandis que des cristaux de weddellite supérieurs à $25 \mu\text{m}$ indiquent une hyperoxalurie associée à une hypercalciurie et un risque lithiasique élevé. Enfin, la présence d'agrégats de cristaux de weddellite suggère une hypocitraturie associée (Cotton et al ; 2014).

Les notions de nombre et de taille des cristaux et des agrégats sont particulièrement utiles pour déterminer le volume cristallin global (VCG) (Fig. 11), un paramètre cliniquement intéressant dans certains contextes pathologiques ainsi que dans le suivi des patients lithiasiques récidivant (Daudon et al, 2012). Le Tableau 5 résume les caractéristiques des cristaux urinaires d'oxalate de calcium et de la signification clinique.

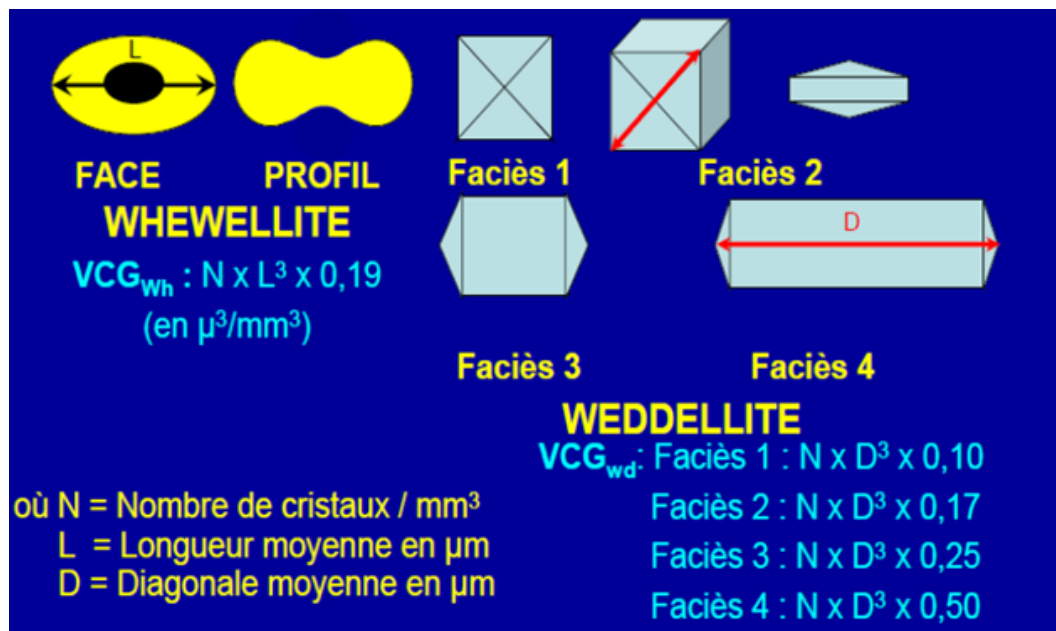


Figure 11 : Faciès cristallins utilisés pour calculer le volume cristallin global de l'oxalate de calcium (VCGoxca) (Daudon, 2014)

Tableau 6 : Caractéristiques des cristaux urinaires d'oxalate de calcium et signification clinique (Daudon *et al*, 2012 ; Daudon, 2015)

Paramètre	Critère	Signification
Whewellite = monohydraté (Wh ou C1) =>Oxalo-dépendante		
Présence	≥ 0.1 cristal/mm ³	Hyperoxalurie
Faciès	Héxagones et navettes étirés	Intoxication à l'éthylène glycol
Quantité	Nombre de cristaux >200/mm ³ Volume cristallin caox >1000µm ³ /mm ³	Hox massive, HOP Chez le patient présentant une HOP : risque d'altération progressive de la fonction rénale par accumulation de cristaux Chez le transplanté rénal ou hépatoréнал, risque d'altération du greffon par cristallisation intratubulaire
Fréquence	Présence dans plus de 50% des urines du réveil	Risque majeur de récurrence lithiasique (>90%)
Weddellite = dihydraté (Wd ou C2) => Calcium-dépendante		
Présence	Octaèdres	Sursaturation OxCa sans signification clinique
Faciès	Dodécaédriques et hexagones	Hypercalciurie franche (> 6mmol)
Quantité	$V_{caox} > 500 \mu m^3/mm^3$	HOP + TR : risque altérat.greffon par cristaux
Taille	>25 µm	HCI + Hox ± hypocitraturie
Agrégats	$\geq 100 \mu m$ Taux d'agrégation > 10%	Déséquilibre entre inhibiteurs et promoteurs de cristallisation Hypocitraturie, risque majeur de récurrence
Fréquence	Présence dans plus de 50% des urines du réveil	Risque majeur de lithiase ou de récurrence (90%)

II.6. Influence de l'oxalate et du calcium dans la cristallisation oxalocalcique

L'influence respective d'une augmentation graduelle de la concentration urinaire de calcium et de l'oxalate est représentée dans la Figure 12, qui montre que le doublement de l'oxalurie par rapport à la valeur normale (d'un sujet non lithiasique) multiplie par 38 le risque de faire des cristaux de whewellite alors que ce risque n'est multiplié que par 4 en cas de doublement de la calciurie (Fig.12 a). Inversement, le doublement de la calciurie par rapport à la calciurie normale d'un sujet sain multiplie par 35 le risque de faire des cristaux de weddellite, ce risque n'est multiplié que par 7.5 en cas de doublement de l'oxalurie (Fig.12 b). Ces données soulignent le rôle déterminant de l'oxalurie dans la formation de la whewellite et celui de la calciurie dans la formation de la weddellite (Daudon *et al*, 2012).

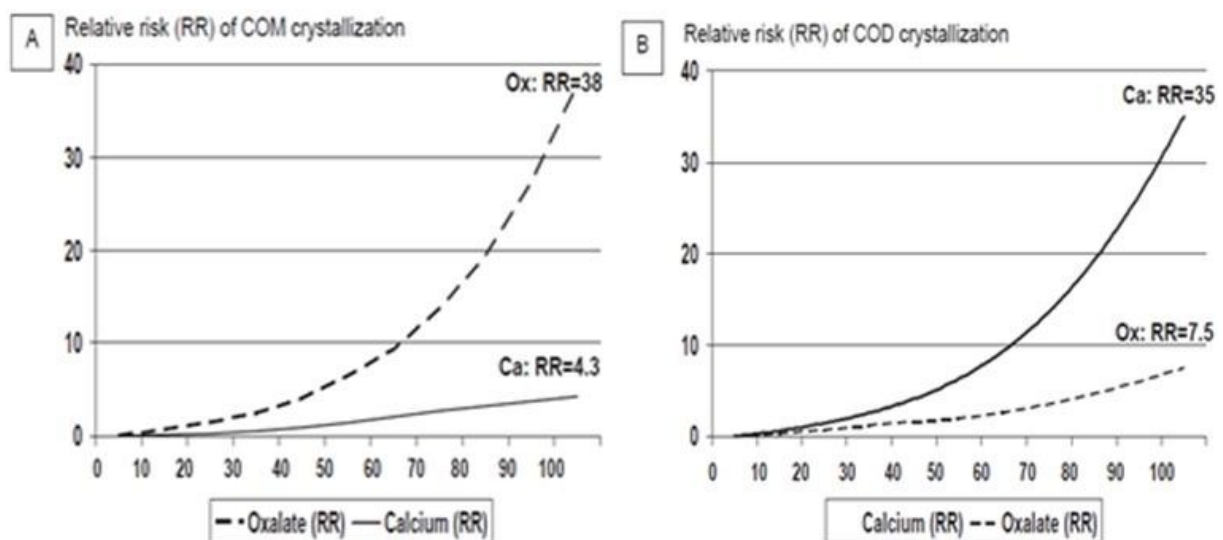


Figure 12 : Influence relative de la concentration de calcium et d'oxalate sur le risque relatif de former des cristaux de COM (Fig.12A) et de COD (Fig.12B) dans l'urine des formateurs de pierres (Daudon *et al*, 2016)

L'influence respective, exprimée en risque relatif (RR), de l'augmentation de la concentration urinaire de l'oxalate et du calcium (en pourcentage d'élévation par rapport à la concentration moyenne observée chez des sujets normaux) dans la formation des cristaux de whewellite et de weddellite. (Daudon *et al*, 2012)

Il a été montré que le produit molaire oxalo-calcique reflète l'état de sursaturation urinaire (Daudon, 1989). Lorsque celui-ci est suffisamment élevé, toutes les urines, qu'elles proviennent de sujets lithiasiques ou normaux, contiennent des cristaux d'oxalate de calcium. Quant à la forme cristalline, mono- (whewellite) ou dihydratée (weddellite), elle dépend principalement (mais pas exclusivement) du rapport molaire calcium/oxalate (rCa/Ox). Lorsque celui-ci est inférieur à 5, ce qui correspond cliniquement à des contextes

d'hyperoxalurie avec calciurie normale ou basse, il se forme essentiellement de la whewellite. A l'inverse, lorsque le rapport molaire est supérieur à 14, ce qui, cette fois, correspond à des situations d'hypercalciurie avec oxalurie normale ou seulement modérément augmentée, la cristallisation se fait essentiellement sous la forme de weddellite (Daudon, 1989 ; Daudon, 2002).

Il est possible de déterminer graphiquement ces deux paramètres en reportant les concentrations mesurées en calcium et en oxalate urinaires sur le nomogramme de la Figure 13. Ce dernier est utilisé pour déterminer la zone de risque du patient lithiasique dans le but d'optimiser la prise en charge thérapeutique.

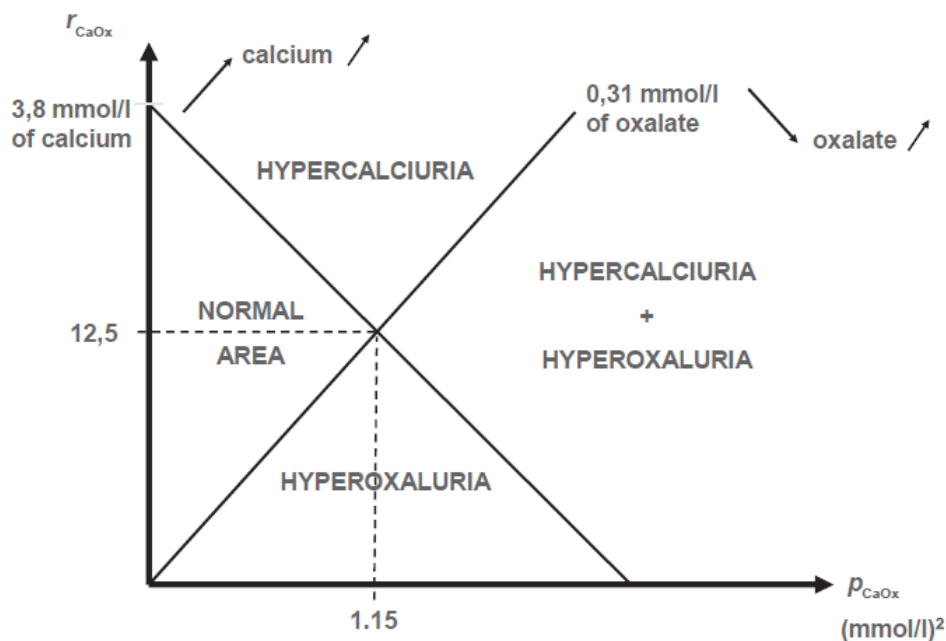


Figure 13: Représentation schématique des zones de risques métaboliques en fonction du produit et du rapport molaire oxalocalciques (Daudon et al, 2016)

II.7. Traitement de lithiase oxalocalcique

II.7.1. Traitement préventif

La mise en œuvre d'un traitement préventif est indispensable pour prévenir ou limiter les récurrences lithiasiques et éviter dans certains cas la survenue d'une maladie rénale chronique (MRC), voire d'une insuffisance rénale terminale (IRT).

Selon Sakly et al. (1994) la meilleure prévention, quelle que soit la nature de la lithiase, est l'apport hydrique abondant. Cet apport se fait de telle sorte que la diurèse soit comprise entre 1600 à 2000 ml / 24 heures. Pour que les urines ne soient pas concentrées il doit être mieux réparti dans le nyctémère.


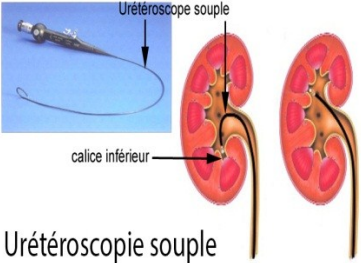
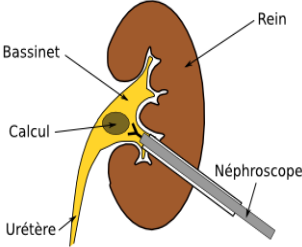
II.7.2. Traitement curatif


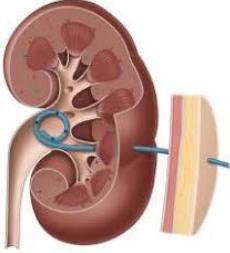
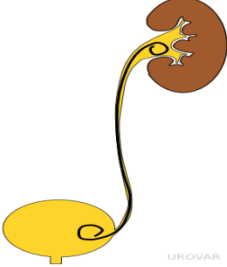
Le but de ce traitement est d'éviter la précipitation cristalline, de favoriser l'expulsion spontanée et d'extraire les lithiases qui ne peuvent être expulsées. Le Tableau 7 résume les mesures thérapeutiques à mettre en œuvre en fonction du type de lithiase oxalocalcique et des anomalies métaboliques caractérisées lors de l'exploration biologique.

Le traitement curatif fait appel aussi à différentes techniques urologiques qui sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 7 : Justification des mesures thérapeutiques vis-à-vis des lithiases rénales (CLAFU, 1996)			
		Mesure thérapeutique	Justification physiopathologique
Hypercalciuries secondaires	Hyperparathyroïdie primaire	parathyroïdectomie	Diminution de la calciurie
	Sarcoïdose	Corticoïdes	
	Acidose tubulaire	Citrate de K	
Hypercalciurie idiopathique diététique dépendante		Régime à 800 mg de Ca, 100 mmole de Na, 1g de protéines (viandes, poissons...)	Diminution de la calciurie, de l'oxalurie et de l'uricurie
Hypercalciurie idiopathique (persistante avec correction diététique)		Thiazide	Diminution de la calciurie
Hyperoxalurie	Diététique (augmentation apports, carence Ca) et entérique	Restriction des aliments riches en oxalates + apports en Ca	Diminution de l'oxalurie
	Vitamine B6 dépendante (hyperoxalurie de Rose, HOP I)	Vitamine B6 à dose physiologique ou pharmacologique	Diminution de l'oxalurie
	HOP I résistante à vitamine B6	Cure de diurèse, orthophosphate, transplantation hépatique	Palliatif Guérison si succès

	HOP II	Cure de diurèse, orthophosphate	
Hyperuricosurie		Allopurinol	Diminution de l'uricurie
Hypomagnésurie		Apport magnésium	Augmentation de la magnésurie
Hypocitraturie		Apport de citrate de K	Augmentation de la citraturie

Tableau 8 : Techniques urologiques, indication et complication (Moulin et al, 2016)			
Technique urologique		Indication	Complication
Lithotritie extra-corporelle (LEC)		<ul style="list-style-type: none"> • Calculs rénaux < 20 mm sauf calice inférieur • Urétéraux < 10mm 	<ul style="list-style-type: none"> • CN (migration de fragments) • Hématurie macroscopique
Urétéroscopie	 <p>Urétéroscopie souple</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Calculs urétéraux et rénaux de taille moyenne (< 15 mm) 	<ul style="list-style-type: none"> • Traumatismes urétéraux (plaies, sténoses) • Infections urinaires
Néphrolithotomie per-cutanée (NLPC)	 <p>UROVAR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Calculs rénaux volumineux (> 20 mm) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hémorragie • Infection • Plaie d'un organe de voisinage

<p>Chirurgie conventionnelle</p>		<ul style="list-style-type: none"> •Calculs coralliformes du rein •Calculs volumineux enclavés dans l'uretère •Échecs des autres techniques •Cas pédiatriques souvent 	<ul style="list-style-type: none"> •Pariétales (infection, hématome) •Thrombo-emboliques •Urologiques (sténoses urétérales)
<p>Néphrostomie percutanée</p>		<ul style="list-style-type: none"> •Échec de drainage par voie endoscopique •Rétention d'urines infectées 	
<p>Montée de sonde JJ</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Drainage en cas de calcul urétéral obstructif • Avant LEC pour faciliter l'élimination des fragments de calcul 	

Parties Pratiques

Partie I

Etude épidémiologique de la lithiase urinaire dans la région Est-Algérien

I. Etude épidémiologique de la lithiase urinaire dans la région Est-Algérien

I.1.Introduction

Le calcul urinaire est un élément clef du diagnostic étiologique de la pathologie lithiasique, non seulement parce qu'il témoigne des facteurs de sursaturation urinaire qui ont conduit progressivement à sa formation, mais aussi parce qu'il est le témoin d'anomalies de composition des urines qui peuvent avoir été transitoires et ont disparu au moment de la découverte de la lithiase.

D'après l'analyse physicochimique, un calcul est une concrétion plus ou moins complexe de substances minérales ou organiques en sursaturation dans l'urine, ils cristallisent en particules, qui seront ensuite agrégées ou agglomérées par des macromolécules urinaires.

Du point de vue étiologique, l'analyse du calcul est une étape essentielle pour déterminer les causes les plus probables et le type de pathologie ayant entraîné sa formation. Pour ce faire, on a opté pour des méthodes physiques fiables bien adaptées à l'analyse des calculs de l'arbre urinaire et à leur diversité telles que la spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse qualitative et quantitative des calculs et les microscopies optique et électronique à balayage pour la détermination des caractères organoleptiques des calculs et l'observation de leur structure intime. Cette démarche peut, de ce fait, contribuer à dégager des mesures prophylactiques adéquates pour prévenir le risque de la récurrence lithiasique.

I.2. Matériel et méthodes

I.2.1.Calculs de l'arbre urinaire

Notre étude s'est étalée sur l'ensemble des calculs de l'arbre urinaire comptabilisant ainsi 953 calculs de la région Est-Algérien (Fig. 14). La collecte des calculs s'est effectuée dans deux principales structures hospitalières de cette région à savoir le service d'urologie du CHU Annaba et l'Etablissement Hospitalier Spécialisé (E.H.S) Nephro-urologique de Constantine. D'autres structures Hospitalières publiques et privées couvrant l'ensemble de la région Est et sud Est du pays ont eu une contribution non négligeable dans cette opération de collecte nous assurant ainsi une couverture conséquente de la région Est Algérien.

Les prélèvements des données et informations des patients et de leurs calculs (âge, sexe, localisation, mode d'élimination, etc ..) ont été effectués à partir des dossiers médicaux ou directement des patients concernés (cas des éliminations spontanées). Ces informations

avec les caractères organoleptiques des calculs sont ensuite enregistrées dans une fiche conçue pour cette tâche (Annexe 1).



Figure 14 : Zone géographique

1.2.2. Analyse des calculs

La Figure 15 illustre l'ensemble du matériel et accessoires utilisés dans l'étude morphologique et constitutionnelle des calculs urinaires. L'analyse des calculs s'est effectuée selon une approche morpho constitutionnelle qui consiste à associer les données collectées par l'observation microscopique, effectuée par loupe binoculaire (Fig. 15 a), et celles de l'analyse spectrophotométrique réalisée à l'aide d'un spectrophomètre infrarouge à transformée de Fourier (Fig. 15 e).

L'examen morphologique des calculs par loupe binoculaire ainsi que la préparation des pastilles pour l'analyse spectrale ont été effectués au niveau du laboratoire de biophysique de la faculté de médecine d'Annaba. L'analyse spectrophotométrique a été réalisée au niveau de l'unité de recherche des transformations de phases de l'Université de Constantine et au niveau de l'EHS Nephro-urologique de Constantine.

Une fois récupérés, les calculs sont nettoyés, séchés à l'air libre, puis font l'objet d'un examen morphologique suivi par une analyse spectrophotométrique infrarouge sélective du noyau jusqu'aux couches externes.

1.2.2.1. Examen morphologique

L'examen morphologique a été réalisé par une loupe binoculaire -OLYMPUS SZ 61- (Fig 15a) éclairée par des fibres optiques avec grossissement variable compris entre 10 et 40 fois. Le relevé des caractères organoleptiques des calculs dont l'aspect du noyau et des couches profondes, moyennes et superficielles du calcul (texture, aspect des cristaux, couleur,

etc..) permet la détermination du (des) type(s) morphologique(s) associé(s) au calcul considéré selon la classification mise au point par Dr.Daudon.M.

Au cours de cette phase d'observation et après la prise des photos des calculs, on a sélectionné les différentes zones d'intérêt qui font l'objet d'un prélèvement spécifique pour une analyse par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (Fig. 15 e). Dans la plupart des cas 4 prélèvements (surface, section, noyau et poudre globale) ont été suffisants pour l'étude spectrale.

Pour l'étude de la morphologie à l'échelle mésoscopique, un microscope électronique à balayage de type JEOL JSM-7100F est utilisé (Fig. 15 f). Dans un premier temps, l'échantillon à analyser est fixé entièrement et collé sur un porte échantillon en métal et de forme circulaire, adaptable au porte-objet du microscope. Le dispositif contenant l'échantillon est placé dans la chambre intérieure du microscope et peut être déplacé à l'aide de verniers pour réaliser le balayage.

1.2.2.2. Analyse infrarouge

L'analyse consiste à identifier la composition moléculaire et cristalline des différentes zones du calcul. Le prélèvement de ces zones est réalisé à l'aide d'un scalpel (Fig. 15 b).

Un échantillon représentatif de chaque zone (surface, section, noyau) a été prélevé et mélangé à une proportion de 0.5 à 2% avec du bromure de potassium (KBr) et très finement pulvérisé et homogénéisé dans un mortier d'agate (Fig. 15 b). La poudre ainsi obtenue est introduite dans le moule à pastiller (Pastilleuse = Presse hydraulique "International Cristal Laboratory". Fig. 15 c,d) et soumise à l'action d'une pression de 10 tonnes/cm² pendant 2 à 3 minutes. La pression supprimée, on récupère une pastille de 13 mm de diamètre et de 1mm d'épaisseur qui sera placée pour analyse constitutionnelle dans un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (BRUCKER ALPHA). Le KBr étant un produit inerte, transparent au rayonnement infrarouge va servir de substrat pour permettre l'analyse des prélèvements de nos calculs. L'enregistrement des spectres Infrarouge est réalisé sur un intervalle de longueurs d'ondes comprises entre 400 et 4000 cm⁻¹ et l'interprétation de ces derniers a été faite par comparaison à des spectres de références (Annexe 2).

Les données de l'analyse morfo-constitutionnelle des calculs font l'objet d'un compte-rendu regroupant des informations collectées sur les caractères organoleptiques du calcul, le typage morphologique ainsi que les résultats de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Annexe 3).

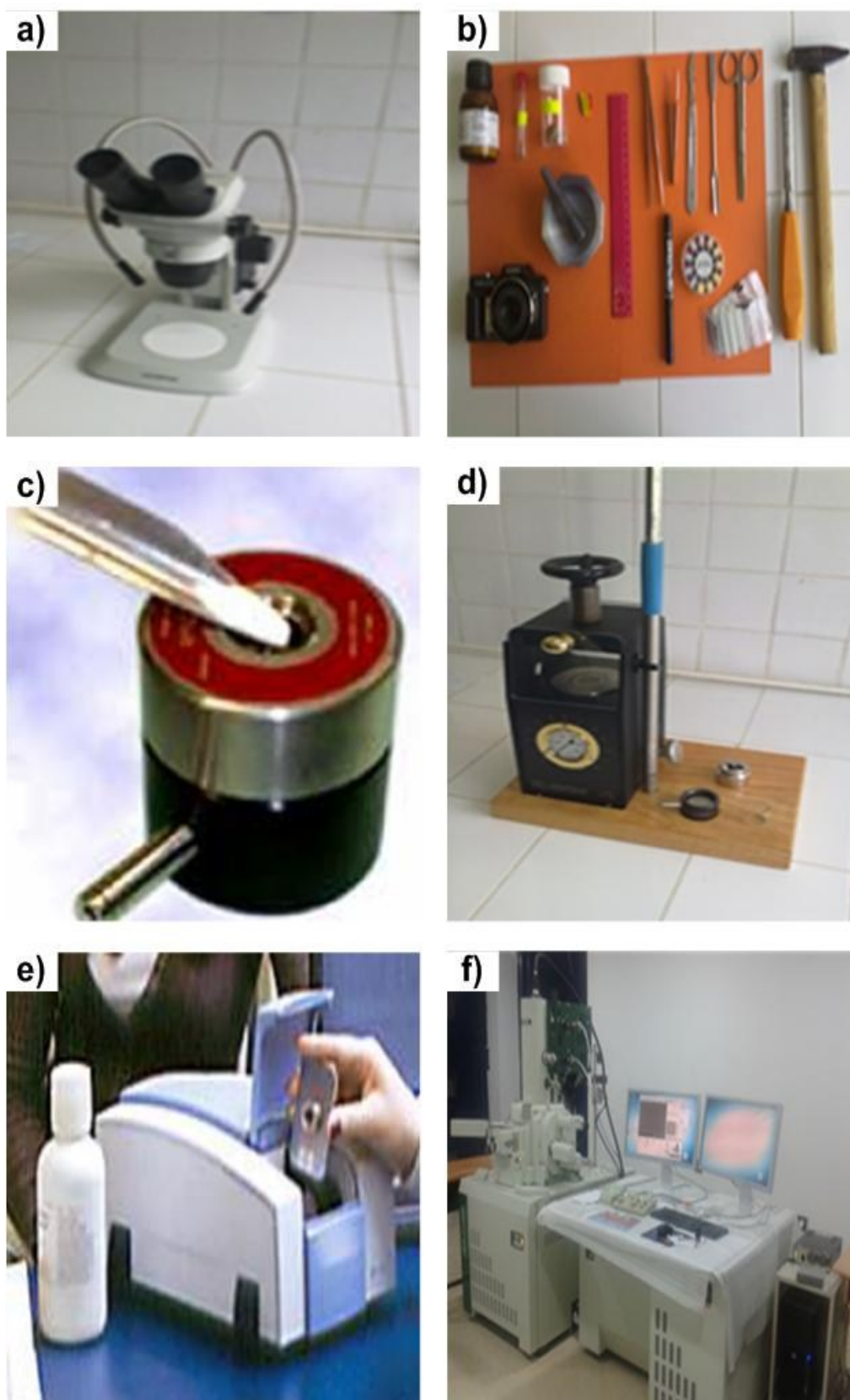


Figure 15: Matériel et accessoires utilisés dans l'analyse morphologique et infrarouge des calculs urinaires. a) Microscope optique, b) Outils de prélèvement et de préparation des pastilles, c) Moule à pastiller, d) Presse hydraulique, e) IRTF, f) MEB

I.3. Résultats de l'analyse constitutionnelle de calculs

I.3.1. Localisation des calculs et ratio Homme/Femme

Par manque d'informations et de précisions en rapport avec la localisation anatomique des calculs urinaires collectés, nous avons subdivisé l'appareil urinaire en deux grandes parties à savoir le haut appareil urinaire (Reins et uretères) et le bas appareil urinaire (vessie et urètre). Ainsi Il ressort de l'étude entreprise que la lithiase du haut appareil urinaire est largement prédominante avec 89.1% des cas en étant plus marquée pour les femmes (97.2%) que pour les hommes (84.7%) (Tableau 9).

Tableau 9 : Distribution selon la localisation anatomique des calculs

Localisation	H	% H	F	% F	Total	% Total
Haut App uri	530	84.94	320	97.26	850	89.19
Vessie	94	15.06	9	2.74	103	10.81
Total	624		329		953	

La répartition des calculs du haut appareil urinaire selon l'âge des patients masculins est sous forme d'une gaussienne dont le maximum se situe au niveau de la tranche d'âge 40-49 ans (Fig. 16 a). Pour la lithiase du bas appareil urinaire on note une progression en fonction de l'âge des patients avec une accentuation de la courbe après 60 ans. Dans le cas des femmes (Fig. 16 b), la répartition des calculs du haut appareil urinaire, se caractérise comme chez l'homme par un maximum pour la tranche d'âge 40-49 ans mais sa distribution qui semble suivre un profil différent où l'on constate une forte progression entre 20 ans et 39 ans et une diminution plus lente du nombre de calculs après 50 ans. La lithiase vésicale reste moindre pour toutes les tranches d'âge des lithiasiques féminins.

Le ratio Homme/Femme (H/F) est de 1.9 pour l'ensemble des cas lithiasique il est cependant égale à 1.65 pour les lithiases du haut appareil urinaire et de 10.4 pour la lithiase vésicale. Ce ratio présente une valeur maximale de 3 dans le cas des enfants de moins de 10 ans et sa plus faible valeur de 1.46 est enregistrée entre 20 et 29 ans. Pour la localisation, le ratio H/F enregistre des valeurs plus importantes au-delà de 50 ans (Tableau 10).

Tableau 10: Sexe-ratio H/F selon les tranches d'âge et la localisation anatomique

	< 10	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	>70	Total
Haut appareil	2.29	1.5	1.38	2	1.87	1.7	1.29	0.89	1.65
Vessie	/	/	5	3	/	13	4.5	31	10.4
Total	3	1.88	1.46	2.03	2.04	1.87	1.55	2.4	1.9

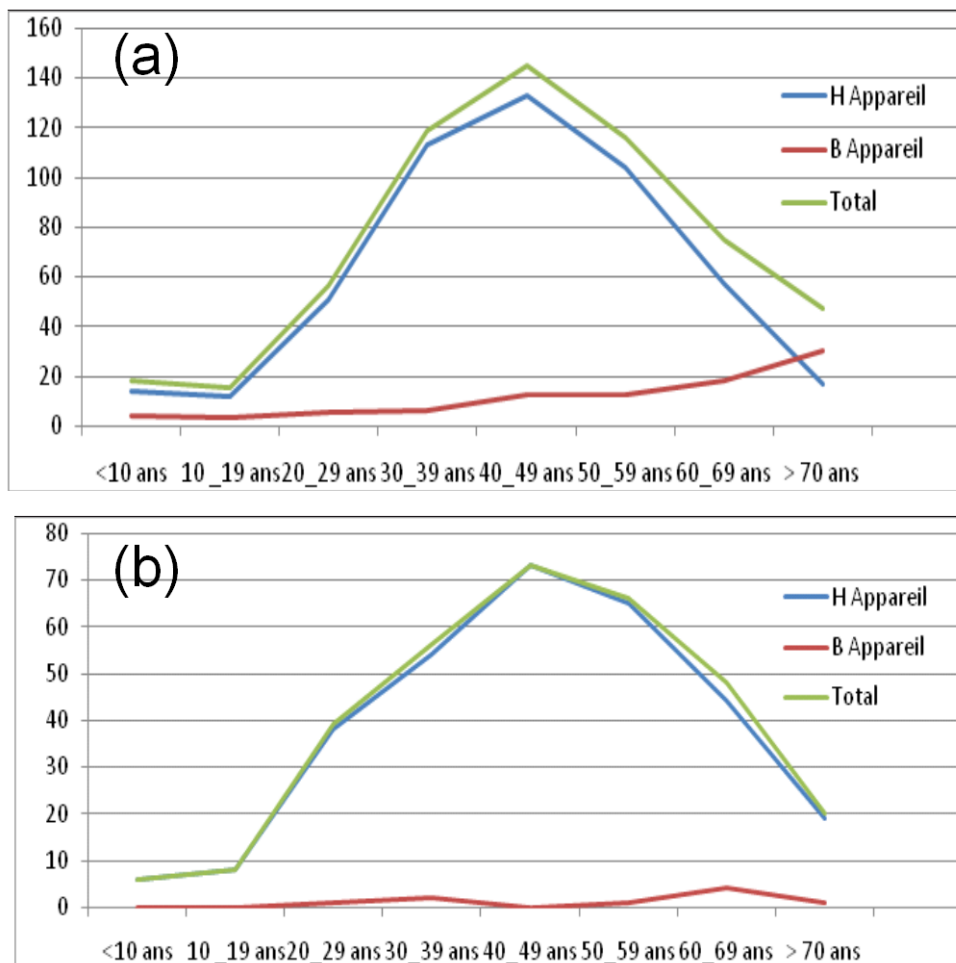


Figure 16 : Répartition en nombre des calculs urinaires selon leur localisation et l'âge des patients

(a) : Cas des hommes

(b) : Cas des femmes

1.3.2. Composition globale des calculs urinaires

Les résultats de l'analyse qualitative des calculs de l'arbre urinaire étudiés sont rassemblés dans le Tableau 11. En termes de fréquences de présence dans les calculs, il ressort que l'oxalate de calcium avec sa forme monohydratée (whewellite) présente la valeur la plus élevée (77.6%), chose qui se confirme pour les deux sexes avec un même ordre de fréquence (H : 78.8% et F : 75.4%). Parmi les phosphates de calcium, la carapatite présente une fréquence de présence globale de 63.2% devant ainsi celle de la weddellite (61.2%). Cette hiérarchie est bien marquée dans le cas des femmes mais inversée pour les lithiasiques masculins (Wed : 65.4% vs CA : 63.3%). Les purines sont présentes avec des fréquences relativement importantes : 26,1% pour l'acide urique et 13.5% pour l'urate d'ammonium. La struvite est présente dans 10% des calculs, là encore sans différence entre les sexes. Pour les autres phosphates, Le phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) est retrouvé

également à égale fréquence pour les deux sexes (9.1%) mais la brushite n'enregistre que des proportions réduites (H : 1.3% vs F : 0.9 %). Finalement la cystine s'affirme avec fréquence de présence relativement élevée (3.1%). Dans la case divers de ce tableau la fréquence de présence atteint une valeur trop élevée attribuée en grande partie aux protéines dont les trames sont souvent associées à la structure même du calcul notamment les calculs oxalocalciques et uriques.

Tableau 11: Fréquence de présence des constituants dans les calculs selon le sexe des patients

Constituants	Homme 624/100%	Femme 329/100%	Total 953/100%
Oxalate de calcium			
Whewellite	492/78.8	248/75.4	740/77.6
Weddellite	408/65.4	175/53.2	583/61.2
Phosphates de calcium			
Carbapatite	395/63.3	207/62.9	602/63.2
Phosphate amorphe de calcium	57/9.1	30/9.1	87/9.1
Brushite	8/1.3	3/0.9	11/1.2
whitlockite	24/3.8	13/4	37/3.9
Struvite (PAM)	66/10.6	34/10.3	100/10.5
Purines			
Acide urique	166/26.6	83/25.2	249/26.1
Urate d'ammonium	79/12.7	50/15.2	129/13.5
Autres urate	1/0.2	5/1.5	6/0.6
Cystine	14/2.2	16/4.9	30/3.1
Divers	296/47.4	129/39.2	425/44.6
Divers : OCP, xanthine, protéines, triglycérides, polysaccharides, médicaments...			

1.3.3. Composants majoritaires dans les calculs

Le Tableau 12 rassemble en nombre et en pourcentage les différents constituants majoritaires dans les calculs en fonction du sexe des patients.

Le composant principal de notre série est l'oxalate de calcium qui est majoritaire dans 64.6% des calculs sous forme de whewellite (47.5%) et à un degré moindre de weddellite (17.1%). Viennent ensuite les acides uriques représentant 12.9%, puis les phosphates calciques (11.9%) majoritairement représentés par la carbapatite (11.3%). En dernier lieu se positionnent la struvite (PAM) avec 4.5%, la cystine avec 3.1% et l'urate d'ammonium avec 0.9%.

1.3.3.1. Influence du sexe

La répartition de ces constituants majoritaires selon le sexe des patients montre que, contrairement à la whewellite, équitablement répartie entre hommes et femmes, la weddellite

est deux fois plus souvent majoritaire dans les calculs d'origine masculine (H : 20.8% vs F : 10%). Pour ce qui est des phosphates de calcium et en particulier la carbapatite, la tendance est renversée avec une proportion environ 3 fois plus importante chez les femmes (F 18.5% vs H : 7.5%). Concernant l'acide urique, il n'y a pas de différence notable entre sexes alors que la struvite apparaît légèrement plus majoritaire chez l'homme (5.1%) que chez la femme (3.3%) et finalement on note pour la cystine une tendance vers une prédominance féminine (F : 4.9% vs H : 2.2%).

Tableau 12 : Fréquence des constituants majoritaires dans les calculs selon le sexe des patients

Constituants	Homme 624/100%	Femme 329/100%	Total 953/100%
Oxalate de Ca	433/69.4	183/55.6	616/64.6
Whewellite	303/48.6	150/45.6	453/47.5
Weddellite	130/20.8	33/10	163/17.1
Phos de Ca	50/8	63/19.1	113/11.9
Carbapatite	47/7.5	61/18.5	108/11.3
<i>Bushite</i>	2/0.3	2/0.6	4/0.4
<i>Phosphate amorphe de calcium</i>	1/0.2	0/0	1/0.1
Struvite(PAM)	32/5.1	11/3.3	43/4.5
Acide urique	82/13.1	41/12.5	123/12.9
Urate d'ammonium	5/0.8	4/1.2	9/0.9
Cystine	14/2.2	16/4.9	30/3.1
Autres	8/1.3	11/3.3	19/2.0
Autres : Xanthine, protéines			

I.3.3.2. Influence de l'âge

Le Tableau 13 illustre l'évolution des quatre premiers constituants majoritaires des calculs en fonction du sexe et de l'âge des patients à savoir : la whewellite, la weddellite, la carbapatite et l'acide urique.

Pour les lithiasiques masculins, on constate que la whewellite prédomine en tant que constituant majoritaire pour toutes les tranches d'âge à partir de l'adolescence (> 10 ans). Sa fréquence reste autour de 50% au-delà de 30. La weddellite, forme dihydratée de l'oxalate de calcium, présente des fréquences plus ou moins stables de 20 ans à 69 ans (aux alentours de 23%) mais insignifiantes au-delà de 70 ans. Pour les moins de 20 ans la weddellite n'est jamais majoritaire dans le calcul contrairement à la carbapatite la fréquence culmine durant l'enfance (42.9%) et reste significative pendant l'adolescence (13.3%). Au-delà, la carbapatite présente des fréquences assez faibles, inférieures à 10% et même au-dessous de 5% à partir de

60 ans. L'acide urique présente un profil particulier avec une valeur relativement importante durant l'enfance (9.5%) et nulle pour l'adolescence, puis une augmentation de la fréquence progressive avec l'âge en passant de 4.3% pour la tranche d'âge 20-29ans à 31.3% au-delà de 70 ans.

En ce qui concerne la femme, le profil de prédominance de la whewellite pour toutes les tranches d'âge se dégage globalement sauf pour la septième décennie où sa fréquence atteint sa valeur la plus faible de 26.5%. La weddellite s'impose dès l'enfance avec des proportions significatives pour atteindre sa plus grande valeur durant l'adolescence avec une fréquence de 25%. Pour les adultes on constate une régression progressive de la weddellite passant de 14.6% (3eme décennie) à 6.7% (5eme décennie) puis une reprise pour la tranche d'âge 50-59 ans et une baisse finale (moins de 5%) au-delà de 60 ans. La carapatite présente des fréquences relativement stables pour toutes les tranches d'âge avec un léger pic à 24% pour la tranche d'âge 40-49 ans. L'acide urique est majoritaire dans 14.3% des lithiases féminines de moins de 10 ans, absent durant l'adolescence et progresse, comme chez l'homme, régulièrement à partir de 20 ans pour atteindre sa valeur maximale de 35% pour les plus de 70 ans.

Tableau 13 : Fréquence des constituants majoritaires dans le calcul selon l'âge et le sexe des patients

Sexe	Consti- tuant	Tranches d'âge								Total : fréq %
		<10	10 – 19	20 - 29	30 – 39	40 – 49	50 – 59	60 – 69	≥ 70 ans	
Homme	Whe	1 / 4.8	10/66.7	22/31.4	68/54	81/52.9	60/48	33/43.4	28/58.3	303 : 48.6%
	Wed	0	0	16/22.9	26/20.6	39/25.5	28/22.4	18/23.7	2/4.2	130 : 20.8 %
	CA	9/42.9	2/13.3	6/8.6	7/5.6	8/5.2	11/8.8	3/3.9	1/ 2.1	47 : 7.5 %
	Ac Ur	2/9.5	0	3/ 4.3	11/8.7	17/11.1	19/15.2	15/19.7	15/31.3	82 : 13.1%
	Total	21	15	70	126	153	125	76	48	624
Femme	Whe	3/42.9	3/37.5	20/48.8	29/46.8	35/46.7	27/40.3	13/26.5	9/45	150 : 45.6%
	Wed	1/14.3	2/25	6/14.6	6/9.7	5/6.7	11/16.4	1/ 2	1/5	33 : 10 %
	CA	1/14.3	1/12.5	6/14.6	11/17.7	18/24	13/19.4	8/16.3	3/15	61 : 18.5 %
	Ac Ur	1/14.3	0	1/ 2.4	4/6.5	6/8	8/11.9	14/28.6	7/35	41 : 12.5%
	Total	7	8	41	62	75	67	49	20	329

1.3.4. Composants majoritaires dans le noyau

Il est important d'analyser le noyau lorsque cela est possible car cette analyse nous renseigne sur la cause initiale de la formation des calculs. Le Tableau 14 représente la fréquence des constituants majoritaires des noyaux selon le sexe des patients. Le composant dominant dans le noyau est la whewellite (37.9%) suivi de la carapatite (20.9%), puis de la weddellite (13.2%) et de l'acide urique (11.9%).

I.3.4.1. Influence du sexe

La distribution des constituants majoritaires dans le noyau selon le sexe montre que les calculs à noyau de whewellite et weddellite sont plus fréquents chez l'homme que chez la femme. Pour ce qui est des constituants nucléiques à prédominance féminine, on trouve la carapatite, l'urate d'ammonium et la cystine.

Tableau 14 : Fréquence des constituants majoritaires des noyaux selon le sexe des patients

Constituants	Homme 624/ 100%	Femme 329/ 100%	Total 953/ 100%
Oxalate de Ca	345/55.3	142/43.2	487/51.1
C1	249/39.9	112/34	361/37.9
C2	96/15.4	30/9.1	126/13.2
Phos de Ca	125/20	89/27.1	214/22.5
CA	118/18.9	81/24.6	199/20.9
Autres PhCa	7/1.1	8/2.4	15/1.6
PAM	33/5.3	14/4.3	47/4.9
Ac Ur	76/12.2	37/11.2	113/11.9
UrAm	15/2.4	17/5.2	32/3.4
Cys	14/2.2	16/4.9	30/3.1
Autres	16/2.6	22/6.7	38/4

Autres : Alph quartz + Triglycérides + Calcite+ Protéines + Mucopolysaccharides

I.3.4.2. Influence de l'âge

Le Tableau 15 résume la répartition de quatre constituants majoritaires dans le noyau selon l'âge et le sexe des patients.

Chez l'homme, la whewellite est abondante dans toutes les tranches d'âge à l'exception de la classe inférieure à 10 ans. La weddellite, absente dans la tranche d'âge inférieure à 10 ans, présente un pic dans la tranche d'âge 20-29 ans puis diminue. Concernant la carapatite, elle représente le composant le plus fréquent des noyaux de la tranche d'âge inférieure à 10 ans et sa fréquence reste importante jusqu'à la tranche d'âge 50-59 ans puis s'abaisse. La fréquence de l'acide urique augmente avec l'âge à partir de la tranche 20-29 ans.

Chez la femme, les noyaux de whewellite sont les plus fréquents dans toutes les tranches d'âge de 20 à 59 ans. On note que la proportion de la weddellite est plus élevée dans les classes inférieures à 30 ans. Les noyaux de carapatite sont fréquents dans toutes les tranches d'âge et présentent un pic à 34.1% dans la tranche d'âge 20-29 ans. Enfin, la fréquence des noyaux d'acide urique augmente avec l'âge à partir de 20 ans.

Tableau 15 : Fréquence des constituants majoritaires dans le noyau selon l'âge et le sexe des patients

Sexe	Constituant	Tranches d'âge								Total : fréq %
		<10	10 – 19	20 - 29	30 – 39	40 – 49	50 – 59	60 – 69	≥ 70 ans	
Homme	Whe	0	7/46.7	15/21.4	48/38.1	65/42.5	60/48	31/40.8	26/54.2	249 : 39.9%
	Wed	0	1/6.7	16/22.9	26/20.6	25/16.3	14/11.2	13/17.1	2/4.2	96 : 15.4 %
	CA	8/38.1	1/6.7	12/17.1	26/20.6	35/22.9	25/20	9/11.8	5/10.4	118 : 18.9 %
	Ac Ur	2/9.5	0	2/2.9	9/7.1	16/10.5	19/15.2	17/22.4	12/25	76 : 12.2%
Femme	Whe	2/28.6	1/12.5	10/24.4	24/38.7	31/41.3	24/35.8	15/30.6	6/30	112 : 34%
	Wed	1/14.3	1/12.5	6/14.6	6/9.7	5/6.7	5/7.5	4/8.2	2/10	31 : 9.4 %
	CA	2/28.6	2/25	14/34.1	10/16.1	20/26.7	18/26.9	8/16.3	6/30	81 : 24.6 %
	Ac Ur	1/14.3	0	1/2.4	2/3.2	4/5.3	9/13.4	14/28.6	6/30	37 : 11.2%

I.4. Résultats de l'examen Morphologique

L'analyse de la composition des calculs (fréquence de présence et composants majoritaires) est insuffisante pour en déduire les liens avec la pathologie, sauf pour les calculs de composition spécifique comme la cystine, la dihydroxyadénine ou la struvite. La morphologie des calculs est essentielle pour établir les relations entre les facteurs biochimiques impliqués dans le processus lithogène, les causes du calcul, l'activité métabolique de la lithiase. La première action entreprise dans l'analyse des calculs de l'arbre urinaire est l'observation de sa structure à l'échelle macro et microscopique. Ces observations permettent de déterminer les caractéristiques organoleptiques de chaque lithiase aussi bien en surface qu'au niveau de sa section. En outre, l'observation de la partie centrale du calcul présente un intérêt particulier pour dégager les conditions de nucléation de chaque calcul. Dans l'ensemble, les caractéristiques organoleptiques permettent de classer les calculs selon un typage morphologique (Classification de M.Daudon) ayant une causalité directe avec les principales orientations étiologiques (Tableau 1). Pour ce qui de notre expérience, l'examen morphologique a été d'un grand intérêt pour contourner certaines nuances rencontrées dans l'analyse de la composition des calculs par spectrophotométrie infrarouge. Cet examen, effectué principalement par loupe binoculaire mais aussi par microscopie électronique à balayage, nous a permis de mettre en évidence plusieurs aspects.

I.4.1. Observations par loupe binoculaire

Ces observations ont été effectuées pour l'ensemble des calculs de notre série et les principaux aspects qui y ont découlés pour combler l'analyse de la composition des calculs se résume par :

➤ **Conversion cristalline weddellite (C2) – whewellite (C1)**

La whewellite constitue la forme la plus stable de l'oxalate de calcium et se forme qu'en conditions d'hyperoxalurie. Lors d'hypercalciurie ce dernier se cristallise en oxalate de calcium dihydraté (composant moins stable) pour former des cristaux quadratiques de weddellite (C2). Plusieurs calculs présentent cependant des indices de conversion cristalline de la forme dihydraté (la moins stable) vers la forme monohydraté (la plus stable). Cette conversion se produit au sein même de l'arbre urinaire avant élimination du calcul et elle reflète soit un séjour prolongé du calcul ou un changement d'environnement initial par la manifestation d'hyperoxalurie intermittente.

L'examen micrographique par loupe binoculaire (Fig. 17) montre différents stades de cette conversion. Il apparaît dans les Figures 17 a et b une conversion cristalline partielle de la weddellite vers la whewellite par la perte de la forme quadratique pour certains cristaux de C2. Dans la Figure 17c la conversion apparaît au niveau d'un cristal présentant les deux morphologies, celle de C2 par sa forme quadratique et celle de C1 par sa couleur brun foncé et sa section radiale concentrique. La Figure 17d montre un stade de conversion plus avancé où certaines spicules de C2 deviennent émoussées alors que d'autres perdent totalement leur forme quadratique pour une forme plus arrondie caractéristique de celle du C1. Les Figures 17 e et f mettent en évidence à un grossissement plus important un stade avancé de cette conversion où les spicules de C2 se réduisent en rayures décorant les forment arrondies de la whewellite. Ces exemples montrent clairement que la limite entre l'hypercalciurie et l'hyperoxalurie pose un réel problème qui ne peut pas être résolu par l'analyse seule de la composition du calcul. Dans ce cas de ce type de conversion (C2 vers C1) l'analyse de la composition du calcul révèle la forme monohydraté de l'oxalate de calcium qui oriente plutôt vers l'hyperoxalurie comme cause principale de lithogénèse alors que réellement c'est l'hypercalciurie qui est la vraie cause.

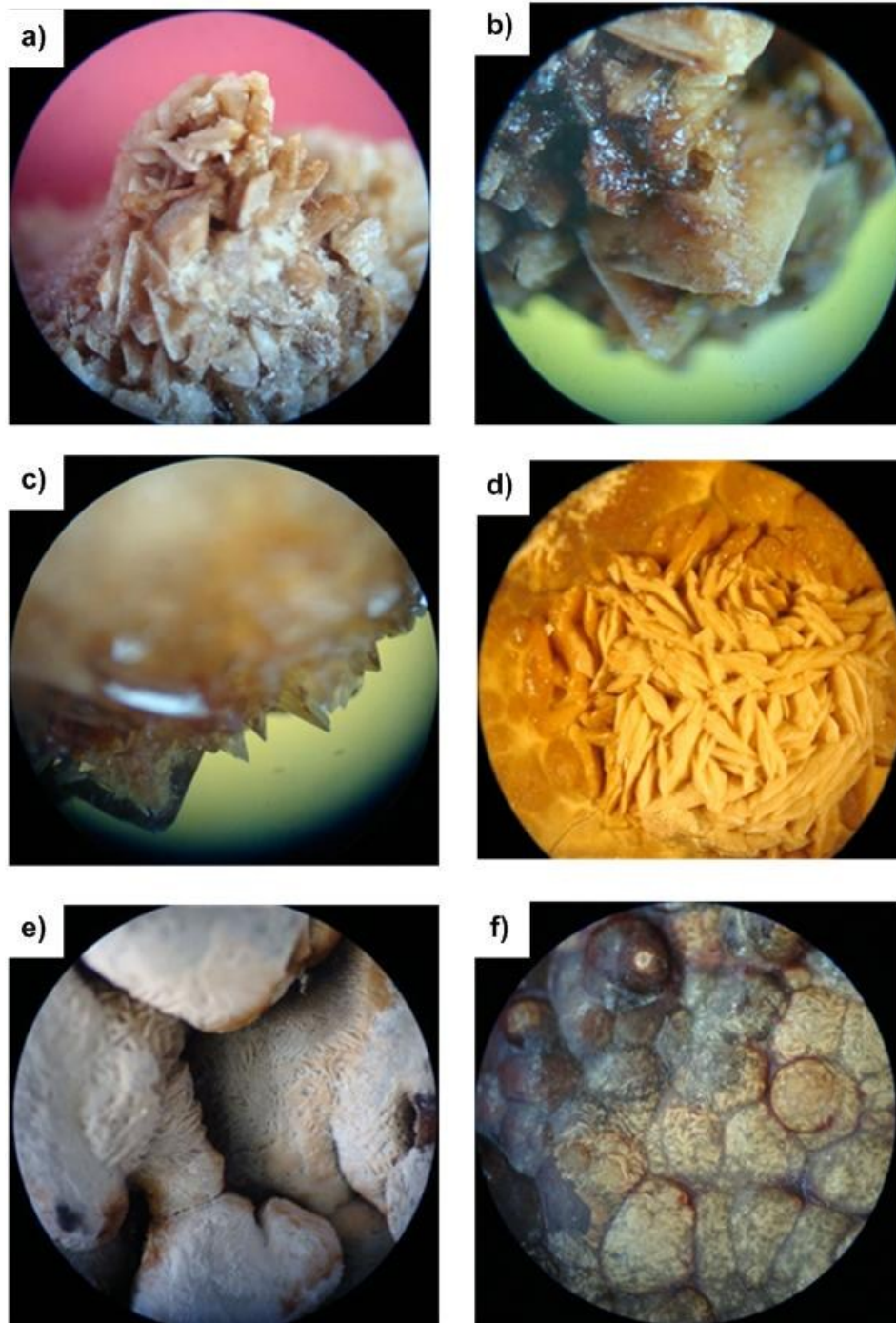


Figure 17 : Calculs urinaires mettant en évidence différents stades de la conversion cristalline de la weddellite vers la whewellite

➤ *Dimension des spicules de weddellite*

La dimension des spicules de weddellite révèle aussi un environnement particulier de lithogénèse. En effet, lorsque la weddellite présente de grosses lames quadratiques d'environ 3 mm de longueur l'hypercalciurie est associée à une hypocitraturie (Fig. 18 a et b). Ce contexte d'hypercalciurie – hypocitraturie est souvent accompagné de whewellite témoin d'hyperoxalurie (Fig. 18c).

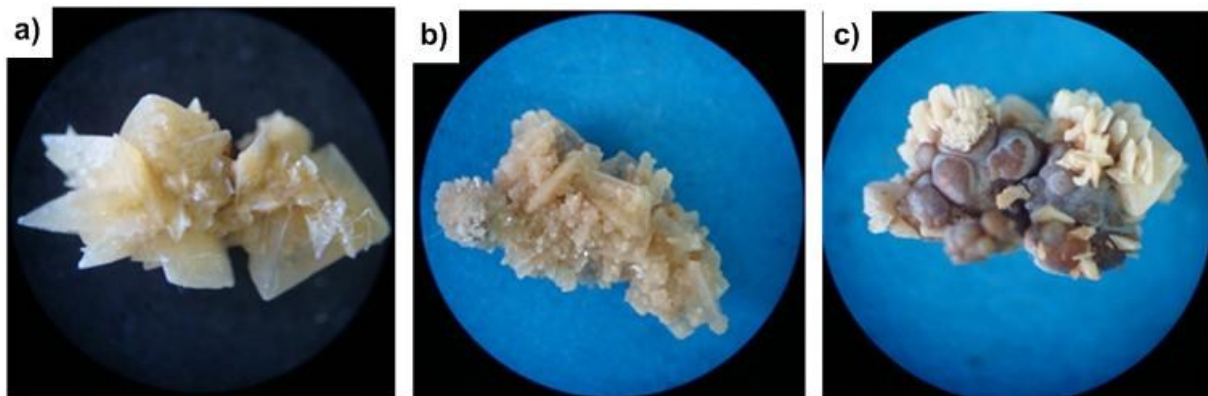


Figure 18 : Calculs urinaires formés dans un contexte d'hypercalciurie + hyperoxalurie + hypocitraturie

➤ *Contexte de lithogénèse et association de composants lithiasiques*

Plusieurs profils de nucléation et croissance peuvent se présenter dans la formation des éléments de lithiase urinaire. A ce niveau aussi, l'apport morphologique apporte des éléments précieux pour l'établissement des principales étiologies. En outre, la croissance lithiasique est souvent à caractère hétérogène où plusieurs composants peuvent se former indépendamment du composant déclencheur de la formation du calcul. Dans les Figures 19 sont illustrées des micrographies assez révélatrices de cet aspect de contexte de lithogénèse et d'association de composants lithiasiques. Dans la Figure 19a on constate que le calcul de whewellite présente une morphologie radiale concentrique de couleur brun foncé dans sa partie centrale et une morphologie plutôt concentrique de couleur plus claire au niveau des couches moyennes et périphériques. L'hyperoxalurie reste la cause principale de lithogénèse mais la forme concentrique renseigne que le calcul s'est développé dans un contexte de stase (confinement anatomique, syndrome de jonction, présence de gros éléments de lithiase etc.). Dans la Figure 19b on révèle un changement radical entre la cause de nucléation (C1 : Hyperoxalurie) et celle de croissance (C2 : Hypercalciurie). La Figure 19c illustre un cas de précipitation hétérogène mettant en cause la carapatite comme composant minoritaire mais responsable de

la nucléation du calcul et la whewellite comme composant majoritaire formé lors de la croissance du calcul. Dans ce cas, le calcul s'est formé par hypercalciurie dans un contexte

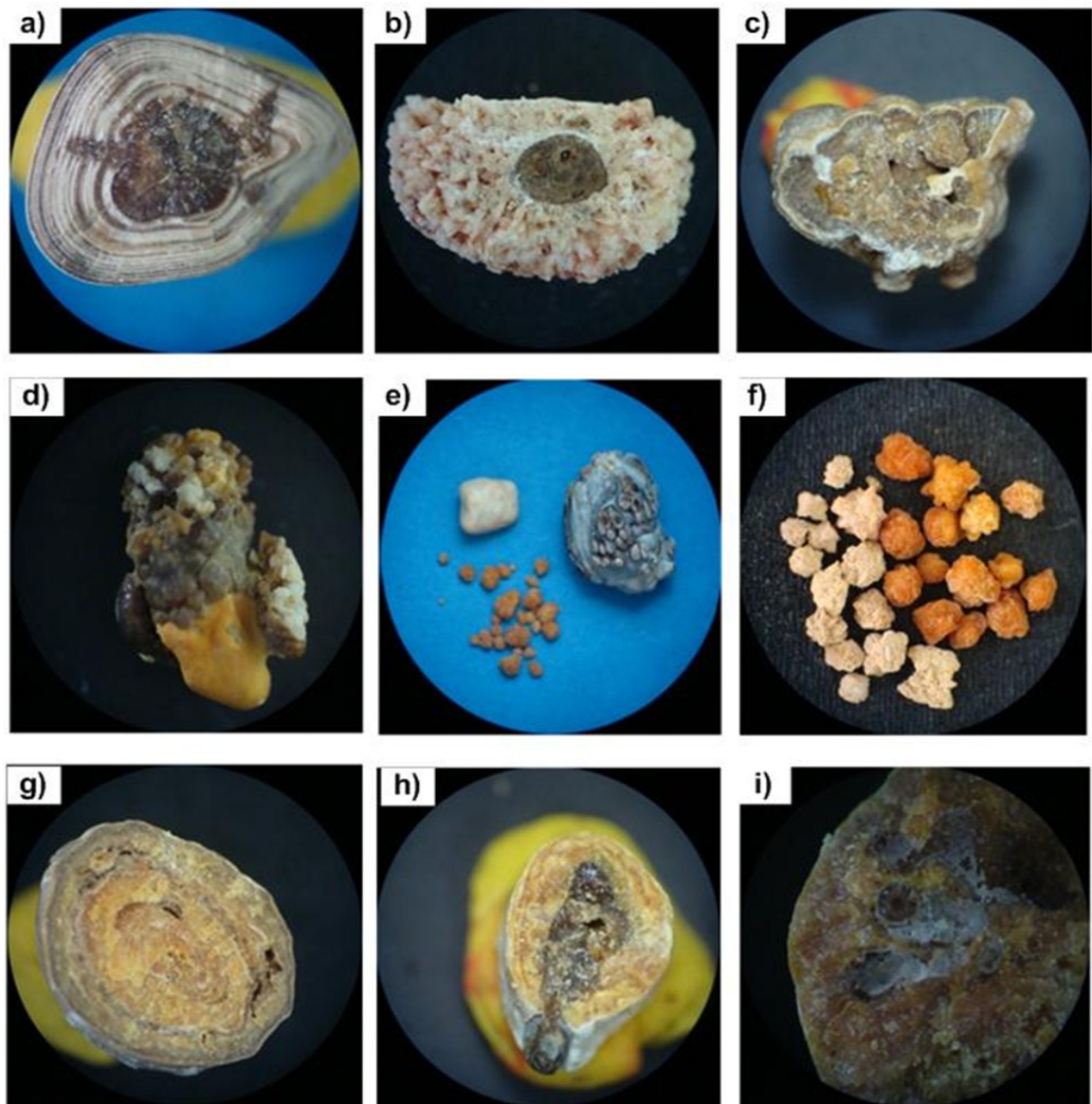


Figure 19: Micrographies de calculs urinaires révélant différentes structures observées lors de l'examen micrographique par loupe binoculaire

particulier de calcification papillaire (Formation de plaque de Randall) et l'hyperoxalurie n'est qu'une cause de croissance bien que l'oxalate de calcium monohydraté soit de loin le composant prédominant.

L'association entre acide urique et oxalate de calcium est assez favorable notamment dans des urines acides ou dans un contexte d'hyper-uricurie associé ou non à une hyper-uricémie. Cette association peut se manifester au sein d'un même élément de lithiase (Fig. 19d). Dans ce cas la section du noyau sera le témoin du processus de lithogénèse du calcul où

deux situations peuvent se présenter : si la partie centrale du calcul est composée d'acide urique (Fig. 19g) on favorise la cause poly-métabolique alors que dans le cas inverse (Fig. 19h) on favorise plutôt une hyperoxalurie de concentration d'origine diététique (consommation excessive de protéines animales) bien que la cause métabolique reste assez probable. Ces deux composants peuvent cependant se présenter séparément (Fig. 19 e,f) présentant ainsi des centres de nucléation différents orientant vers des causes multiples de nucléations. Enfin l'association Acide urique-oxalate de calcium peut s'accompagner d'un complément d'urate d'ammonium (Fig. 19 i) dans ce cas on s'oriente vers une hyperuricurie associée à une hyperuricémie.

1.4.2. Observations par microscope électronique à balayage (MEB)

Nécessitant un matériel lourd et pas souvent disponible, les observations au MEB ont été effectuées pour un nombre réduit de lithiases de l'arbre urinaire de notre série. Le complément d'analyse apporté est considérable car il permet de visualiser la structure intime des calculs, les morphologies particulières avec lesquelles ils se présentent à l'échelle mésoscopique voir nanométrique, les jonctions entre composants lithiasiques et enfin de détecter des composants minoritaires non révélés par l'analyse spectrophotométrique ni observé par microscopie optique. De ce fait, plusieurs aspects ont été révélés par MEB dont les principaux sont :

➤ Différenciation des apatites induites par hypercalciurie et celles d'origine infectieuse

La Carbapatite (Carbonate apatite) est un composant lithiasique connu pour être présent d'une façon très abondante dans les calculs de l'arbre urinaire bien que sa fréquence de présence en tant que constituant majoritaire reste relativement faible. Sa formation peut cependant être induite soit par hypercalciurie ou par la présence de germes ayant une activité uréolytique (Cas de l'infection urinaire à germes uréasiques). Par microscopie électronique à balayage la carbapatite se présente en sphérules de dimension micrométrique (Fig. 20). Dans le cas d'infection ces sphérules présentent en surface des empreintes induites par les germes uréasiques (Fig. 20 a) alors que dans un contexte non infectieux la surface des sphérules d'apatite est dépourvue de ces empreintes (Fig. 20 b).

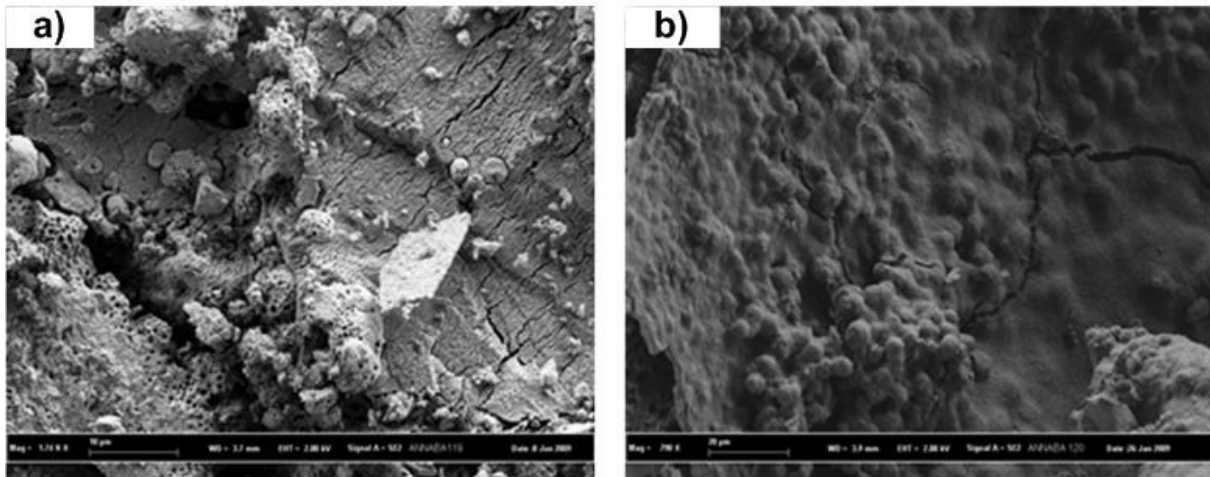
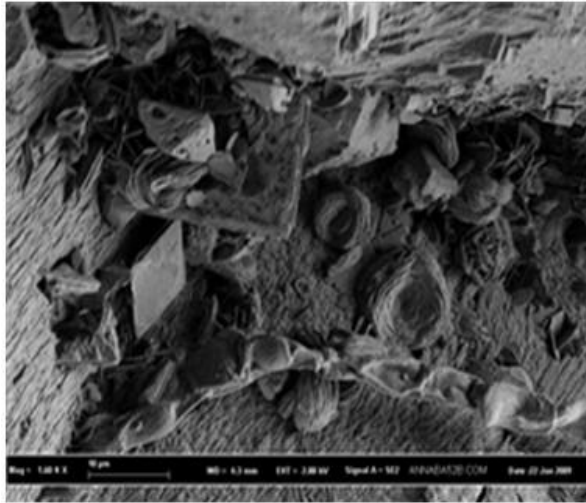


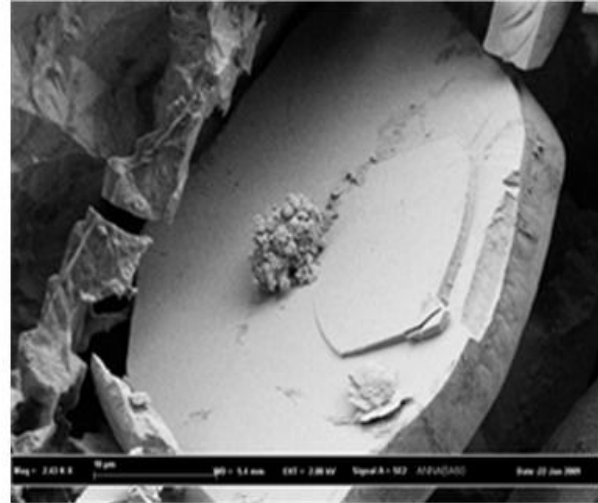
Figure 20 : Sphérules de carbapatite formées dans un contexte d'infection urinaire à germes uréasiques et présentant des empreintes en surface (a) et celles formées dans un contexte d'hypercalciurie dépourvue d'empreintes en surface (b)

➤ *Cristallites et conditions de lithogénèse*

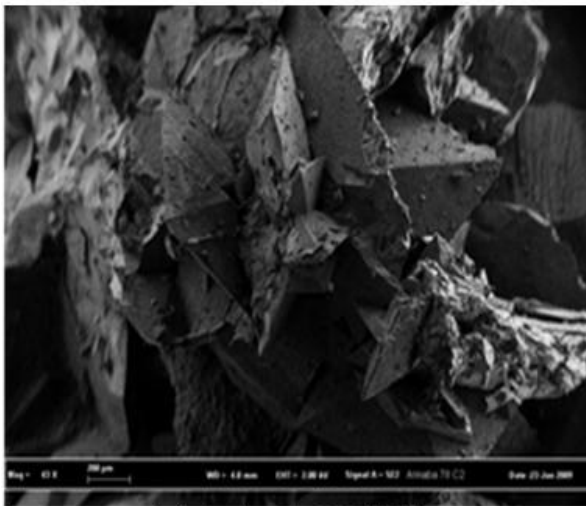
Les conditions de lithogénèse sont multiples et diversifiées et dans le cas des composants oxalocalciques et phosphocalciques plusieurs formes de cristallites peuvent se manifester pour un seul et unique composant témoignant ainsi des conditions particulières de sa formation. Dans la Figure 21a, l'oxalate de calcium se forme en cristallites ayant une forme en rose de sable laissant prédire un processus rapide de formation où l'activité de ce composant est très intense. La forme en latte de ce même composant (Fig. 21 b) suggère plutôt une activité plus lente de ce dernier. La formation des spicules quadratiques d'oxalate de calcium dihydraté (Fig. 21c) intervient lors d'hypercalciurie de concentration et elle est souvent hétérogène comme dans le cas de la Figure 21d où l'on constate qu'un voile d'apatite décore la surface de ces spicules dans un environnement d'hypercalciurie/hyperphosphaturie. En outre, l'apatite s'observe souvent en présence de whewellite (Fig. 21 b) dans ce cas l'hypercalciurie peut se manifester d'une façon intermittente dans un environnement initial d'hyperoxalurie. Les Figures 21 e et f relèvent des conditions de précipitation hétérogènes souvent rencontrées dans la lithiase calcique il en résulte une concurrence dans la formation des composants induits par hyperoxalurie et/ou hypercalciurie



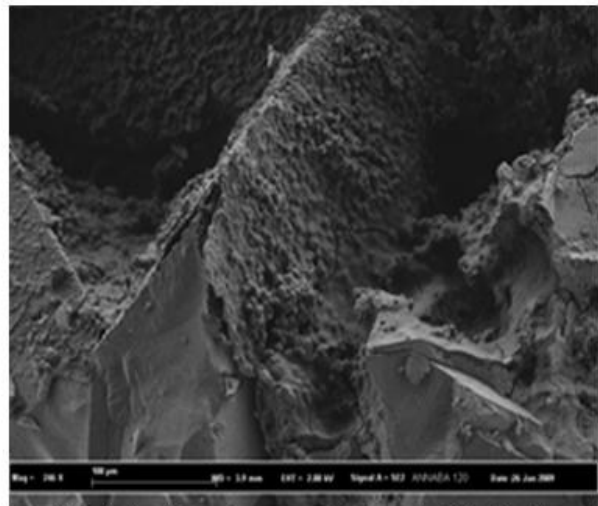
a) Whewellite en forme de rose



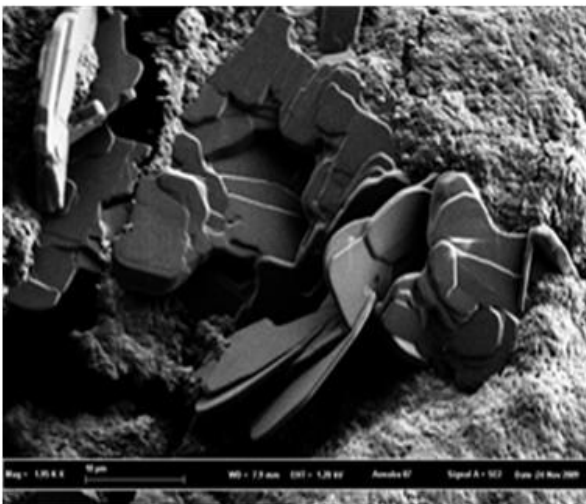
b) Whewellite en latte avec un dépôt d'apatite



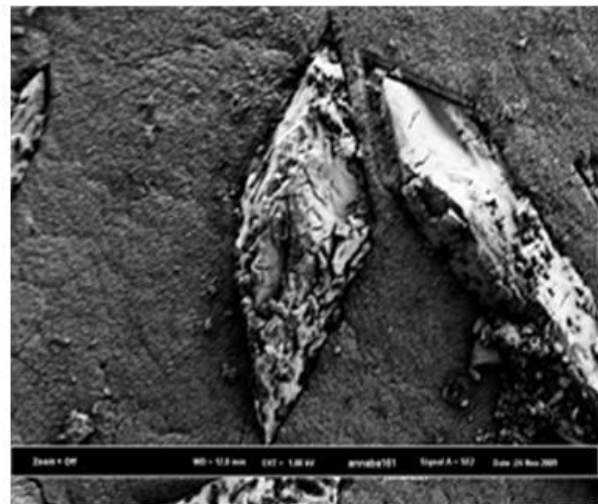
c) Spicules de Weddellite



d) Dépôt d'apatite sur spicules de Weddellite



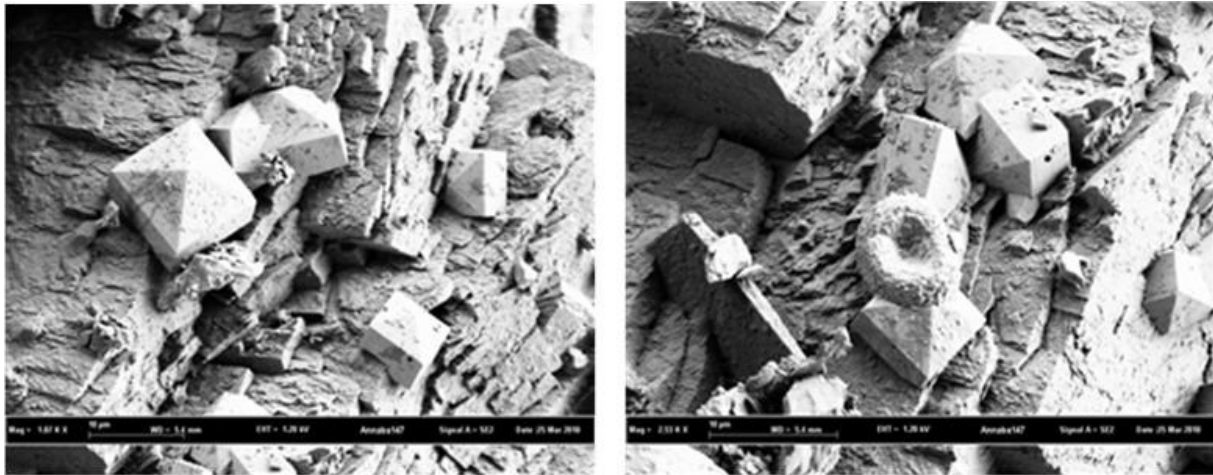
e) Lattes de Whewellite sur fond d'apatite



f) Spicules de Weddellite sur fond de whewellite

Figure 21 : Micrographies de calculs urinaires révélant l'influence des conditions de lithogénèse sur la forme des cristallites des composants urinaires et la diversité des modes de leur association.

Lors d'hypercalciurie majeure, l'oxalate de calcium dihydraté forme des cristaux dodécaédriques (Fig. 22a) souvent associés à des sphérules d'apatite. La Figure 22b illustre ce dernier cas en mettant en évidence le lien intime entre un cristal dodécaédrique de weddellite et une sphérule d'apatite.



a) Cristaux dodécaédrique de weddellite formé dans un contexte d'hypercalciurie majeure

b) Précipitation hétérogène weddellite octaédrique – apatite : hypercalciurie majeure

Figure 22 : Cristallite de weddellite observée lors d'hypercalciurie majeure

➤ *Observation de composants minoritaires*

L'un des problèmes majeurs de l'analyse spectrophotométrique et sa limite de détection des composants minoritaires. Il se trouve que la présence même en faible proportion de certains composants lithiasiques peut avoir une signification clinique et orienter vers des étiologies particulières. Le cas de l'urate d'ammonium est assez significatif ; sa présence dans les noyaux des calculs oxalocalciques notamment la whewellite signifie que le calcul s'est formé dans un contexte de mal nutrition et de carence phosphorée. Sa détection par IRTF est cependant assez délicate surtout lorsqu'il se présente avec des faibles proportions. L'exploration au MEB de certains de nos calculs a révélé justement la présence de ce composant non détecté lors de l'analyse par IRTF (Fig. 23a). L'urate d'ammonium, qui se cristallise en aiguilles rassemblées sous forme d'oursin, est aussi observé en présence d'acide urique (cas d'hyperuricurie + hyperuricémie) ou de struvite dans un contexte d'infection urinaire à germes uréasiques (Fig. 23b)

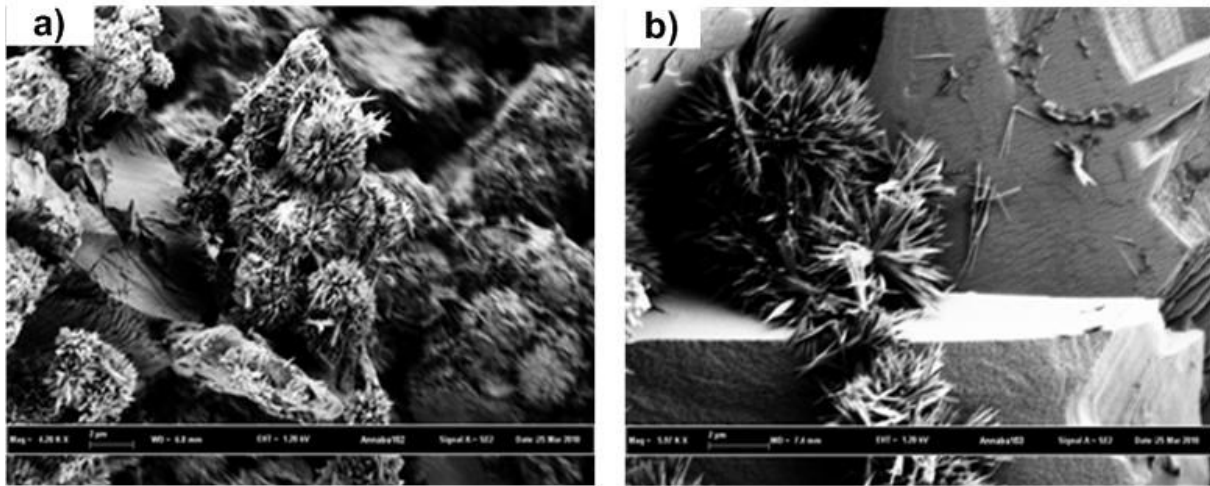


Figure 23 : Aiguilles d'urate d'ammonium en forme d'oursin formées dans un contexte de mal nutrition en présence de whewellite (a) et formé dans un contexte d'infection urinaire à germes uréasiques en présence de struvite (b)

I.5. Résultats de l'évaluation par typage morphologique

Dans ce qui suit, nous avons déterminé les fréquences des différents types morphologiques, identifiés par loupe binoculaire, et de leurs associations pour l'ensemble des 953 cas lithiasique étudiés (Tableau16). Cette étape permettra, de ce fait, de dégager les principales orientations étiologiques en rapport avec la formation des calculs urinaire de notre série. En outre, nous avons séparé la partie centrale du calcul (noyau) du reste du calcul (section plus surface) pour distinguer entre les causes de la nucléation des calculs de celles responsables de leur croissance.

Il ressort pour les deux sexes que le typage unique est beaucoup plus fréquent au niveau des noyaux que dans le reste des calculs (53.9% vs 36.9%) ce qui dénote que la croissance des calculs présente un contexte plus diversifié que celui de leur nucléation initiale. Cette tendance est plus marquée pour le type IV (Noy : 14.2% vs Cal : 7.66), le type III (Noy : 14.4% vs Cal : 8.92) et le type II (Noy : 10.1% vs Cal : 6.93). Pour ce qui est du type I on constate qu'il présente la plus grande fréquence comme type unique dans les calculs mais il est dépassé par les types III et IV au niveau des noyaux. La séparation par sexe des patients a révélé que le type II prédomine pour les hommes alors que le type IV est à prédominance féminine et cela aussi bien dans le noyau que dans le reste du calcul.

En termes d'associations de types morphologiques, les plus grandes fréquences sont enregistrées pour les combinaisons entre les types I, II et IV. Au niveau du noyau la prédominance revient à l'association II + IV (Noy : 16.9% vs Cal : 12.9) alors qu'au niveau du reste du calcul c'est les associations I+II (Noy : 6.4% vs Cal : 15.9%) et I+II+IV (Noy :

6.9% vs Cal : 16.4%) qui prédominent. Ces tendances restent invariables avec le sexe des patients.

Tableau 16: Fréquences de présence des types morphologiques et leurs associations au noyau et en surface des calculs urinaires selon le sexe

Typage	NOYAU						CALCUL					
	Homme			Femme			Homme		Femme		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
I	74	11.9	38	11.6	112	11.8	60	9.62	37	11.6	97	10.2
II	73	11.7	23	6.99	96	10.1	54	8.65	12	3.65	66	6.93
III	96	15.4	41	12.5	137	14.4	56	8.97	29	8.81	85	8.92
IV	70	11.2	65	19.8	135	14.2	40	6.41	33	10.0	73	7.66
V	14	2.24	17	5.17	31	3.25	13	2.08	17	5.17	30	3.15
VI	1	0.16	0	0	1	0.10	/	/	/	/	/	/
I+II	43	6.89	18	5.47	61	6.40	112	17.9	40	12.2	152	15.95
I+III	21	3.37	8	2.43	29	3.04	35	5.61	17	5.17	52	5.46
I+IV	22	3.53	27	8.21	49	5.14	27	4.33	23	6.99	50	5.25
I+VI	0	0	2	0.61	2	0.21	1	0.16	1	0.30	2	0.21
II+III	9	1.44	6	1.82	15	1.57	6	0.96	3	0.91	9	0.94
II+IV	109	17.5	52	15.8	161	16.9	76	12.18	47	14.3	123	12.9
III+IV	6	0.96	4	1.22	10	1.05	14	2.24	8	2.43	22	2.31
IV+VI	/	/	/	/	/	/	1	0.16	0	0	1	0.10
IV+V	0	0.16	0	0	1	0.10	1	0.16	0	0	1	0.10
I+II+III	4	0.64	0	0	4	0.42	12	1.92	5	1.52	17	1.78
I+II+IV	44	7.05	15	4.56	59	6.19	106	16.9	50	15.2	156	16.4
I+III+IV	1	0.16	2	0.61	3	0.31	2	0.32	1	0.30	3	0.31
I+II+VI	2	0.32	0	0	2	0.21	1	0.16	1	0.30	2	0.21
II+III+IV	1	0.16	0	0	1	0.10	0	0	1	0.30	1	0.10
IV+III+VI	2	0.32	0	0	2	0.21	1	0.16	1	0.30	2	0.21
IV+VI+I	1	0.16	0	0	1	0.10	1	0.16	0	0	1	0.10
I+II+III+IV	1	0.16	0	0	1	0.10	1	0.16	1	0.30	2	0.21
I+II+IV+VI	1	0.16	0	0	1	0.10	/	/	/	/	/	/
Total existant	597		320		918		624	100.0	329	100.0	953	100
Manquant	27		9		35		/	/	/	/	/	/
TOTAL	624	100	329	100	953	100	624	100.0	329	100.0	953	100

Une première esquisse des résultats de l'étude morphologique fait ressortir que les pathologies les plus fréquentes aussi bien dans la nucléation que dans la croissance des calculs sont l'hyperoxalurie (associée au type I) et l'hypercalciurie (associée au type II et partiellement au type IV).

Pour cerner d'une façon plus précise les causes en rapport avec la lithiase calcique de notre série on a déterminé les fréquences de présence des sous-types des types I, II et IV et leurs associations (Tableau 17).

Tableau 17: Fréquence de présence de sous types et associations de sous types des calculs calciques selon le sexe

TYPAGE	NOYAU						SURFACE					
	Homme		Femme		Total		Homme		Femme		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Ia	201	28.85	99	28.27	300	28.65	315	49.84	159	43.47	474	47.64
Ib	15	2.40	6	1.82	21	2.20	18	2.88	6	1.82	24	2.52
Ic	1	0.16	4	1.22	5	0.52	3	0.48	4	1.22	7	0.73
Id	4	0.64	3	0.91	7	0.73	29	4.65	14	4.26	43	4.51
Ie	1	0.16	3	0.30	4	0.10	2	0.32	4	0.61	5	0.21
Ila	142	22.76	55	16.72	197	20.67	218	34.94	117	35.56	335	35.15
Ilb	124	25.64	59	21.28	230	24.13	198	31.73	91	27.66	289	30.33
Ilc	0	0	0	0	0	0	1	0.16	1	0.30	2	0.21
IVa1	204	32.69	142	43.16	346	36.31	215	34.46	122	37.08	337	35.36
IVa2	1	0.16	3	0.61	3	0.31	3	0.48	8	1.52	8	0.84
IVb	19	3.04	24	7.29	43	4.51	16	2.56	20	6.08	36	3.78
IVc	22	3.53	16	4.86	38	3.99	22	3.53	15	4.56	37	3.88
IVd	0	0	2	0.30	2	0.10	4	0.16	6	1.82	10	0.73
Ila + Ilb	84	13.46	40	12.16	124	13.01	120	19.23	70	21.28	190	19.94
IVa1 + IVa2	0	0	3	0.91	3	0.31	2	0.32	8	2.43	10	1.05
IVa1 + IVb	2	0.32	9	2.74	11	1.15	11	1.76	9	2.74	20	2.1
IVa1 + IVc	10	1.60	7	2.13	17	1.78	21	3.37	11	3.34	32	3.36
IVa1 + IVd	0	0	2	0.61	2	0.21	3	0.48	3	0.91	6	0.63
IVb + IVc	5	0.81	6	1.82	11	1.15	8	1.28	9	2.74	17	1.78
IVb + IVd	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.30	1	0.10
IVa1+IVb+IVc	0	0	0	0	0	0	2	0.32	5	1.52	7	0.73
Total Existant	598	100.0	320	100.0	818	100.0	624	100.0	329	100.0	953	100.0
Maquant	26		9		35		/	/	/	/	/	/
Total	624	100.0	329	100.0	953	100.0	624	100.0	329	100.0	953	100.0

Cette répartition en sous type nous a permis de distinguer entre des étiologies franches (cas des sous types Ic, Ie et Id, IVa2) de celles à caractère idiopathique ou intermittent (Ia, Ila, Ilb, IVa1). En outre, pour ce qui du type IV on a pu faire une décantation entre les sous types en rapport avec une infection urinaire franche (IVb et IVc) de ceux ayant trait à des causes plus diversifiées pouvant impliquer des cas d'hypercalciurie et d'hyperphosphaturie idiopathiques complexes (Hypercalciurie idiopathique, hyperoxalurie idiopathique, hypocitraturie idiopathique,... etc)

Dans le Tableau 18 sont rassemblées les fréquences des principales étiologies déterminées exclusivement à partir de l'analyse de la composition des calculs et le typage morphologique qui les caractérise (Approche morpho-constitutionnelle). Ainsi déterminées, ces fréquences ne présentent donc qu'une estimation des principales orientations étiologiques responsables de la formation des calculs analysés. Il y a lieu de signaler que cette approche morpho constitutionnelle pour l'analyse des calculs a un apport considérable pour déterminer les conditions lithogènes de chaque cas lithiasique mais un complément d'analyse et d'investigation, impliquant des radiographies des bilans urinaires et plasmatiques ainsi que l'analyse de la cristallurie, reste nécessaire pour cerner au mieux ces conditions. En outre, on a trouvé utile de distinguer entre les principales orientations étiologiques au niveau de la

partie centrale du calcul, siège de la nucléation, de celles se manifestant lors de la croissance où d'autres processus peuvent éventuellement se manifester.

Tableau 18 : Estimation des principales orientations étiologiques évaluée selon l'approche morpho constitutionnelle de M Daudon

Principales étiologies	Hommes : 624/100%		Femmes : 329/100%		Total : 953/100%	
	Initiation	Croissance	Initiation	Croissance	Initiation	Croissance
Hyperoxalurie	214/34.3	333/53.4	110/33.4	165/50.2	324/34	498/52.3
Hypercalciurie et /ou Hyperphosphaturie	360/57.7	404/64.7	167/50.7	195/59.2	527/55.3	599/62.9
Hyperuricurie, Hyperacidité urinaire	85/13.6	73/11.7	49/14.9	52/15.8	134/14.1	125/13.1
Infection urinaire	85/13.6	89/13.8	63/19.1	64/19.4	148/15.2	153/16.1
Cystinurie	14/2.2	14/2.2	17/5.2	17/5.2	31/3.3	31/3.3

Dans le Tableau 19 on s'est focalisé sur les principales orientations étiologiques en rapport avec la lithiase calcique (oxalocalcique et phosphocalcique). Cette décanation plus raffinée nous a permis de distinguer entre la lithiase calcique primitive (ou idiopathique) et secondaire (celle qui relève d'une pathologie bien définie). L'hyperoxalurie et l'hypercalciurie idiopathiques sont considérées comme telles lorsque respectivement chacune d'elle constitue l'unique cause ou en étant prépondérante en association avec d'autres causes de lithogénèse telles que l'hypocitraturie, l'hyperuricurie...etc. Dans ce Tableau on a aussi tenu compte de l'association hyperoxalurie-hypercalciurie relevée dans plusieurs cas de lithiases.

Tableau 19 : Estimation des orientations étiologiques de la lithiase calcique évaluée selon l'approche morpho constitutionnelle de M Daudon

Principales étiologies	Hommes : n°= 624/100%				Femmes : n° = 329/100%				Total : n°= 953/100%			
	Initiation		Croissance		Initiation		Croissance		Initiation		Croissance	
Hyperoxalurie idiopathique	205		324		99		154		304		478	
	65*	140**	26*	298**	27*	72**	15*	139**	92*	212**	41*	437**
Hyperoxalurie primaire	3				4				7			
Hyperoxalurie absorbptive Pathologies intestinales (maladie de Crohn ... ;	2				4				6			
Hyperoxalurie associée à une Stase ou un confinement anatomique (Syndrome de jonction ,...)	4		29		3		14		7		43	
Hypercalciurie idiopathique	336		380		149		172		485		552	
	117*	219**	69*	311**	67*	82**	28*	144**	184*	301**	97*	455**
Hyperparathyroïdie 1 et 2	9		9		7		7		15		15	
Diabète phosphaté	4		4		3		3		7		7	
Cachi Ricci	8		8		5		5		13		13	
Acidose tubulaire distale	3		3		3		8		6		11	
Hypercalciurie +Hyperoxalurie	124		198		59		91		183		289	

*Unique

** En association

I.6. Discussion

La lithiase urinaire fait partie des grandes pathologies comme l'hypertension artérielle, les maladies cardiovasculaires ou le diabète, en raison de l'intervention des facteurs endogènes, héréditaires ou non, et des facteurs nutritionnels et d'environnement qui ont une incidence considérable sur l'excrétion et la concentration des solutés lithogènes urinaires (Daudon, 2005). De ce fait, l'étude épidémiologique basée sur l'analyse des calculs est donc essentielle pour mieux évaluer les évolutions de la maladie et ses relations avec les pathologies ou les facteurs de risque impliqués dans son développement.

Dans notre étude est exposée l'analyse de 953 calculs de l'arbre urinaire, collectés au niveau de la région Est Algérien, selon une approche morpho-constitutionnelle. Les résultats obtenus nous ont permis, au-delà des aspects épidémiologiques (sexe des patients, localisation anatomique, composition des calculs et orientations étiologiques ...etc), d'évaluer l'incidence de la lithiase oxalocalcique et de dégager ses principales causes et étiologies au niveau de cette région Est-Algérien.

➤ *Rapport H/F*

La lithiase de l'arbre urinaire est plutôt à prédominance masculine avec un sex-ratio (Homme/Femme) variant généralement entre 1.3 et 2.5 (Scales et al, 2007 ; Trinchieri, 2008) où les plus faibles ratios ont été relevés aux états unis (Scales et al, 2007) et au japon (Yoshida et al, 1990). Dans une étude établie sur un échantillon représentatif aux Etats Unis, Scales et al. (2007) relèvent que cette prédominance s'est atténuée au profit d'une augmentation spectaculaire de 1997 à 2002 de la maladie lithiasique chez les femmes en rapport avec des facteurs de risque associés au mode de vie, tels que l'obésité.

Dans notre série ce ratio étant de 1.9 et rejoint du moins les valeurs enregistrées dans l'Ouest Algérien (Harrache et al, 1997 ; Djelloul et al, 2006 ; Abbassene et al, 2020), au Maghreb (Oussama et al, 2000) mais aussi dans ceux enregistrés dans des pays industrialisés (Daudon et al, 2008 ; Gadisseur et al, 2014). La variation de ce ratio en fonction de l'âge fait ressortir que sa valeur la plus faible (de 1.46) correspond à la tranche d'âge 20-29 ans mentionnant ainsi une incidence accrue de cette pathologie pour les jeunes adultes femmes. Dans son étude épidémiologique, établie en France et englobant 51 747 calculs, M. Daudon et al ont constaté qu'une inversion de ce ratio H/F (0.83) est relevée dans le cas des adolescents (de 15 à 20 ans) (Daudon et al, 2008). La valeur la plus élevée du ratio H/F a été enregistrée pour les sujets de moins de 10 ans (3) traduisant ainsi des facteurs de risque lithogènes particuliers chez le garçon. Dans cette tranche d'âge, la lithiase est dominée par la carbapatite.

Cela est en accord avec les études antérieures, en Algérie et en France, qui ont constaté qu'une proportion importante de lithiase qui peut se former au début de la vie est phosphatique, essentiellement d'origine infectieuse (Djelloul *et al*, 2006 ; Daudon, 2000).

➤ **Localisation anatomique**

Dans l'ensemble des cas lithiasiques, la localisation des calculs est plutôt rénal (haut appareil urinaire) pour les deux sexes. La lithiase vésicale est, quant à elle, rare chez la femme (2.7%) mais plus prononcée chez l'homme (15%). Cette nette distinction est d'origine anatomique vu que la lithiase vésicale est favorisée chez l'homme suite aux complications prostatiques dont sont victimes les adultes et plus précocement les hommes de plus de 50 ans (Klimas *et al*, 1985 ; Valeri *et al*, 1999). Il est à noter que dans notre série la lithiase vésicale prédomine dans le cas des hommes de plus de 70 ans où le cas des patients lithiasiques présentant une hypertrophie prostatique associée souvent à un adénome est le plus fréquent.

➤ **Mode d'élimination**

La chirurgie classique qui représente 81% des cas de notre série, a été le mode d'extraction le plus fréquent en raison de l'absence, sinon la non abondance, de dispositifs utilisant des techniques sophistiquées tels que l'urétéroscopie (rigide et souple), la néphrolithotomie percutanée (NLPC) et la lithotritie extracorporelle (LEC). Il est à noter aussi une prise en charge, souvent tardive des patients lithiasiques, favorisant une croissance importante de leur lithiase délimitant ainsi, à cause de l'urgence et la grosseur des calculs, le choix des urologues vers la chirurgie classique. Il faut aussi noter que 16% de nos lithiases ont été éliminées spontanément.

➤ **Composition des calculs**

L'analyse séquentielle des calculs par méthode spectrophotométrique infrarouge nous a permis de déterminer avec précision leur composition chimique, et de présenter la fréquence de ces composants lithiasiques. Les principaux composants identifiés sont : les oxalates de calcium, les phosphates de calcium, la struvite, les purines ainsi que la cystine.

- **Oxalates de calcium**

L'étude des grandes séries de calculs analysés dans divers pays montre une nette prépondérance de la lithiase oxalocalcique, présente comme constituant majoritaire dans plus de 60% des calculs (Djelloul *et al*, 2006 ; Daudon *et al*, 2008 ; Alaya *et al*, 2012 ; Castiglione *et al*, 2014). Le composant principal de notre série est également l'oxalate de calcium qui est majoritaire dans 64.6% dont 47.5% en whewellite et une proportion moindre de 17.1% en

weddellite. Ces deux formes cristallines de l'oxalate de calcium se forment dans des contextes pathologiques différents et leur présence oriente, de ce fait, vers des étiologies spécifiques différentes.

La whewellite, l'espèce cristalline la plus abondante, est une forme monohydraté de l'oxalate de calcium, se cristallise dans un environnement d'hyperoxalurie avec une calciurie normale ou faible, elle est, de ce fait, oxalate-dépendante (Daudon *et al*, 1985 ; Daudon *et al*, 1998). La présence de whewellite oriente vers une hyperoxalurie de concentration ou de débit. L'origine de cette hyperoxalurie peut être exogène ou endogène. Il faut aussi signaler que la fréquence élevée de la whewellite dans les calculs de l'arbre urinaire est liée à une sursaturation rapide des urines en ce composant vu sa faible limite de solubilité et ce indépendamment de la valeur du pH urinaire (Breslau *et al*, 1987).

La weddellite est la forme dihydratée de l'oxalate de calcium et se forme dans un environnement hypercalciurique avec une oxalurie normale ou modérément augmentée, elle est, de ce fait, calcium dépendante (Daudon *et al*, 1985 ; Asplin *et al*, 1998). Ses fréquences de présence, et en tant que composant majoritaire, aussi bien dans le calcul que dans le noyau, sont pour les deux sexes plus faibles que celle de la whewellite. Ces fréquences sont proches de celles de la région Ouest-Algérien (Djelloul *et al*, 2006) et légèrement en-deçà de celles rapportées en France et en Belgique (Daudon *et al*, 2008 ; Castiglione *et al*, 2014), ce qui dénote une tendance de l'hypercalciurie en Algérie vers celles des pays industrialisés. La weddellite se forme souvent dans un contexte hétérogène associée le plus souvent à la whewellite et à la carbapatite mais aussi avec les autres composants comme les purines. Sa prédominance est plutôt masculine et se manifeste en tant que composant majoritaire dans le calcul deux fois plus chez l'homme que chez la femme (H : 20.8% vs F : 10%). Cette tendance est observée aussi dans le noyau des calculs (H : 15.4% vs F : 9.1%). Ce résultat est conforme avec ceux mentionnés dans plusieurs études comprenant de grandes séries de calculs à l'exemple de celle entreprise en France par Daudon *et al*. (2008) comprenant plus de 50 000 calculs.

- *Phosphates de calcium*

L'autre fraction de la lithiase calcique se focalise sur les calculs phosphocalciques. La fréquence de ce type de calculs, majoritaires en phosphates de calcium, est de 11.9% dont la carbapatite constitue l'espèce cristalline la plus majoritairement fréquente (11.3%). Cette dernière a une fréquence de présence de 63.2%, compose le noyau de 20.9% des calculs et s'associe le plus avec les composants oxalocalciques. Il ressort à première vue que la carbapatite s'impose plus comme composant d'initiation des calculs plutôt qu'un composant

de croissance. L'initiation des calculs oxalocalciques sur une calcification, majoritaire en carapatite, développée au niveau des papilles rénales a été révélée pour la première fois par A. Randall (Randall, 1936). Ce genre de plaque, qui porte d'ailleurs son nom « Plaque de Randall », et qui relève d'un processus hétérogène de lithogénèse explique en partie les proportions importantes de la carapatite au niveau des noyaux que dans le reste des calculs. En outre, la proportion des calculs phosphocalciques majoritaires est beaucoup plus élevée chez la femme (19.1%) que chez l'homme (8%). Cette prédisposition de la femme à former des calculs de carapatite plutôt que d'oxalate de calcium s'explique en partie par les différences hormonales entre les sexes, la production d'œstrogènes chez la femme se traduisant, dans les urines, par une phosphaturie et un pH urinaire plus élevés que chez l'homme (Daudon et al, 2012). On remarque aussi une proportion élevée de calculs de carapatite chez les garçons de moins de 10 ans favorisés, dans ce cas, par des processus infectieux.

- *Struvite*

Parmi les autres constituants lithiasiques, on distingue la struvite (phosphate ammoniaco-magnésien), marqueur d'infection chronique de l'appareil urinaire par des micro-organismes possesseurs d'une uréase active (Griffith et al, 1987), qui, en hydrolysant l'urée, produit les quantités d'ions ammonium nécessaires pour élever le pH et pour générer une sursaturation suffisante de l'urine en struvite qui entraîne sa cristallisation (Daudon et al, 2012). Dans notre série, la struvite est majoritaire dans uniquement 4.5% des calculs, alors que sa fréquence de présence est plus de deux fois supérieure (10.5%) ce qui signifie qu'à côté des étiologies responsables de la formation des calculs, il y a une infection urinaire à germes uréasiques. Cette proportion est près de deux fois plus élevée par rapport à celle observée en France (4.5%) (Daudon et al, 2008) et près de trois fois moins que dans la série de la région Ouest Algérien (28.8%) (Djelloul et al, 2006).

- *Purines*

La lithiase non calcique est chapeauté par les puriques avec une fréquence de présence de 40.3% dans l'ensemble des calculs. On y distingue en premier l'acide urique majoritaire dans 12.9% des calculs et 11.9% des noyaux sans distinction apparente entre sexes. Ce résultat indique que les facteurs et processus de formation de ce composant s'impose équitablement lors de sa germination et sa croissance. Une répartition selon l'âge des patients montre de son côté que ce composant est plus fréquent à partir de la 6^{ème} décennie. En termes d'association l'acide urique présente le plus d'affinité avec la whewellite. Dans l'ensemble, nos résultats sont en accord avec ceux observés dans les pays

occidentaux et Magrébins, où la lithiase d'acide urique représente de 8.4 à 21.6 % comme composant majoritaire (Djelloul et al, 2006 ; Daudon et al, 2008 ; Alaya et al, 2012 ; Castiglione et al, 2014). La formation de ce type de calcul est due à une alimentation riche en purines, des modifications métaboliques liées au vieillissement notamment une altération progressive de l'ammoniogenèse rénale chez les sujets âgés, qui s'accompagne d'une baisse du pH urinaire favorable au développement de ce genre de calculs (Daudon, 2003 ; Neuzillet et al, 2004). Cependant, d'autres facteurs de risques ont été impliqués afin d'expliquer la formation des calculs d'acide urique, indépendamment de l'âge, notamment le diabète, l'obésité et l'hypertension artérielle (Alaya et al, 2012). L'autre composant purique qui a marqué notre série est l'urate acide d'ammonium avec une fréquence de présence de 13.5%. Comme composant majoritaire, l'urate d'ammonium s'impose dans 3.4% des noyaux de nos calculs mais seulement 0.9% dans l'ensemble du calcul. Ce composant se confirme plus lors d'initiation des calculs que lors de leur croissance.

- *Cystine*

Enfin, la lithiase cystinique, due à un trouble inné du métabolisme, est habituellement diagnostiquée chez le sujet jeune, mais des rechutes peuvent survenir à tout âge en cas de traitement inadapté ou interrompu. Dans notre série, la lithiase cystinique qui représente 3.1% des calculs avec une prédominance féminine (4.9% contre 2.2% chez l'homme), est plus fréquente par rapport à celle observée dans les autres pays (Djelloul et al, 2006 ; Daudon et al, 2008 ; Alaya et al, 2012 ; Castiglione et al, 2014). Cela pourrait s'expliquer par les mariages consanguins qui sont fréquents dans la région Est Algérien.

➤ *Etiologies*

Les principales orientations étiologiques en rapport à la formation des calculs étudiés ont été déterminées suite à la corrélation de la composition des calculs avec leurs caractéristiques morphologiques. L'information récoltée de ce type d'orientation est d'un apport important pour soutenir tout suivi approprié permettant d'éviter la récurrence lithiasique.

D'après une première approche, l'hypercalciurie et l'hyperoxalurie sont les causes les plus fréquentes dans la formation des calculs de notre série. Ces étiologies sont dans la majorité des cas idiopathiques et en association avec d'autres étiologies dont l'hyperuricurie, l'hyperuricémie, l'infection urinaire, la stase urinaire ...etc. L'initiation des calculs par hypercalciurie (englobant l'hypercalciurie-phosphaturie et quelle qu'en soit l'origine) touche plus que la moitié des calculs étudiés (55.3%) et sa contribution dans leur croissance est confirmée dans plus de 60% (62.9%). L'hyperoxalurie, toute origine confondue, survient à un

degré moindre avec 34% dans l'initiation des calculs mais s'impose d'avantage, avec 52.3%, dans leur croissance. Ce résultat dénote l'ampleur de lithiase calcique et sa prédominance dans la lithiase de l'arbre urinaire au niveau de notre région Est-Algérien. Ce constat est en parfaite concordance avec celui des pays industrialisés où la lithiase calcique (oxalocalcique et phosphocalcique) présente près de 90% de la totalité des calculs urinaire (Daudon, 2005).

Parmi les pathologies recensées dans notre série et qui sont liées à la lithiase calcique secondaires il y a ceux qui relèvent de l'hyperoxalurie d'origine endogène comme l'hyperoxalurie primaire, la maladie de Crohn et les anomalies anatomiques. Il y a aussi ceux qui relèvent de l'hypercalciurie secondaire qui sont cerner dans l'hyperparathyroïdie, le diabète phosphaté, la maladie de Cacchi Ricci (ou rein en éponge) et enfin, l'acidose tubulaire distale.

L'orientation vers l'hyperuricurie (avec ou sans hyperuricémie) avec une acidité excessive des urines est soutenue par la formation des purines et en particulier l'acide urique avec ses sous types IIIa et IIIb. Dans notre série, cette étiologie s'impose avec une fréquence de 14,1% lors de l'initiation des calculs sans distinction apparente entre sexes et elle s'affirme d'avantage pour les personnes âgées. L'âge est un facteur favorisant de ce type d'étiologie par l'altération progressive de la capacité rénale d'ammoniogenèse qui se manifeste justement avec l'âge. Cette altération va faire défaut à élimination de la charge acide endogène et conduira par conséquent à une baisse du pH urinaire favorisant la formation d'acide urique (Agarwal et al, 1980). Indépendamment de l'âge, une augmentation significative de l'acidité urinaire par anomalies métaboliques a été observée aussi bien chez les sujets en surpoids (Maalouf et al, 2004) que les sujets diabétiques (Pak et al, 2003) les exposant aussi à la formation de la lithiase urique.

Les marqueurs potentiels de la lithiase d'infection sont la struvite (infection à germes uréasiques) l'urate d'ammonium, la carbapatite avec un taux de carbonatation de plus de 15%, la whitlockite et le phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC). Comme étiologie, l'infection urinaire, avec ou sans germes uréasiques, touche une proportion relativement importante de notre cohorte de patients (environ 15%) avec une légère prédominance féminine. Ce type d'étiologie est en nette régression dans les pays industrialisés à cause d'une prise en charge précoce de la maladie lithiasique comme elle est deux fois plus prononcée chez la femme dans ces pays (Daudon et al, 2008).

L'analyse morpho-constitutionnelle est une approche assez performante qui permet d'aplanir le terrain d'investigation pour distinguer les causes de la lithogenèse primitives et secondaires. Dans le prochain chapitre on consacra une étude épidémiologique sur la

lithiase calcique d'origine papillaire et sa contribution dans la formation de la lithiase oxalocalcique majoritaire au niveau de notre région Est-Algérien. En outre, une étude consacrée à certains cas cliniques d'hyperoxalurie primaire fera le thème de la partie pratique III.

I.7. Conclusion

Dans l'ensemble, le profil épidémiologique de la lithiase de l'arbre urinaire se rapportant à la région « Est Algérien » présente plusieurs similitudes avec celui des pays industrialisés. Notant en l'occurrence un ratio Homme/Femme de 1.9, une localisation au niveau du haut appareil urinaire qui prévaut à 89.19% et une lithiase vésicale 5.5 fois plus prononcée chez les hommes. La composante lithiasique de la série étudiée fait ressortir, aussi bien en termes de fréquence de présence qu'en termes de composant majoritaire (noyau et calcul), une prédominance de la lithiase calcique. Les composants oxalocalciques présentent cependant les fréquences les plus élevées suivis par les composants phosphocalciques. L'examen micrographique par loupe binoculaire et par microscopie électronique à balayage des calculs nous a été d'un appui considérable. Dans ce sens, plusieurs structures ont été révélées mettant en évidence leurs caractéristiques organoleptiques leurs inter-jonctions, leur associations et leurs évolutions. Une analyse selon une approche morfo-constitutionnelle a été ainsi entreprise pour faire ressortir les causes les plus probables de la formation des calculs étudiés. On a pu constater alors que l'hypercalciurie (associée ou non avec l'hyperphosphaturie) et l'hyperoxalurie sont les causes d'initiation et de croissance les plus répandues. L'infection urinaire reste une cause de néphrolithiase non négligeable (initiation : 15% et croissance:16%) elle est suivie par l'hyperuricurie englobant aussi bien l'hyperacidité urinaire et les causes métaboliques. Notre série s'est caractérisée cependant par un taux élevé de la lithiase cystinique d'origine congénitale (cystinurie-lysinurie).

Une étude étiologique plus exhaustive focalisée sur les lithiases oxalocalcique et phosphocalcique a mis en évidence l'ampleur de la lithiase calcique primitive (hypercalciurie et hyperoxalurie idiopathiques) tout en mettant en évidence d'autres causes d'origine bien établie (lithiase calcique secondaire). Dans la suite de ce travail, on essaiera en premier lieu d'éplucher certains aspects concernant la lithiase oxalocalcique majoritaire initiée sur une plaque phosphocalcique (plaque de Randall). En second lieu, on essaiera d'étaler la prise en charge de cas cliniques en rapport avec la lithiase oxalocalcique primaire.

Partie II

Lithiase induite par calcification

papillaire

(Plaque de Randall)

II- Lithiase induite par calcification papillaire (Plaque de Randall)

II.1. Introduction

La formation des calculs rénaux à partir d'une calcification initiale développée au niveau de l'épithélium papillaire a été émise comme hypothèse dans les années 1930 par l'urologue américain Alexander Randall ([Randall, 1936](#) ; [Randall, 1940](#)). Désignée depuis sous le nom de plaque de Randall, cette calcification ectopique sert de support à la formation de calculs oxalocalciques ayant une morphologie assez particulière caractérisée par la présence d'une ombilication en surface sur laquelle on retrouve souvent un résidu de cette plaque ([Daudon et al, 2007](#)). Les travaux de Randall ont bénéficié d'un regain d'intérêt récent grâce aux progrès de l'endoscopie qui permet de visualiser directement *in vivo* la présence des plaques papillaires et des calculs qui y sont attachés. Plusieurs travaux se sont ainsi focalisés sur la pathogenèse de ces calcifications ([Low et al, 1997](#) ; [Linnes et al, 2013](#)). Du point de vue épidémiologique, les études sur la formation des calculs ombiliqués présentant ou non des plaques de Randall restent peu nombreuses mais assez révélatrices d'une nette augmentation de la prévalence des calculs initiés sur une plaque ([Daudon et al, 2015](#) ; [Letavernier et al, 2016](#)). Une première étude menée au sein de notre laboratoire a permis de mettre en évidence l'existence de ce type de lithogenèse au niveau de la région Est Algérien ([Bousslama et al, 2015](#)). Pour une étude épidémiologique plus complète, nous nous sommes fixés comme objectif de vérifier la fréquence de ce type de calculs en considérant une série plus importante de patients lithiasiques et, en tenant compte du sexe et de l'âge de ces derniers.

II.2. Matériel et méthodes

Notre étude porte sur un total de 1067 calculs du haut appareil urinaire collectés au niveau de la région Est Algérien entre janvier 2007 et septembre 2016. En se basant sur la morphologie particulière des calculs formés sur une plaque de Randall (PR), nous avons identifié 204 cas de lithiases présentant une ombilication papillaire. Sur la Figure 24 sont illustrés différents types de calculs d'origine papillaire analysés dans notre laboratoire. Un résidu de la plaque de Randall est observé dans la majorité de ces calculs nécessitant dans certains cas un examen stéréo-microscopique minutieux afin de le détecter. Pour l'analyse de nos calculs nous avons adopté l'approche morfo-constitutionnelle décrite précédemment et qui associe le typage morphologique des calculs avec leur composition chimique. Une attention particulière a été accordée au résidu de plaque de Randall, qui constitue le noyau du calcul. Finalement, la fréquence de la lithiase oxalocalcique initiée sur une plaque de Randall a été estimée par rapport à l'ensemble des calculs du haut appareil urinaire de notre série.

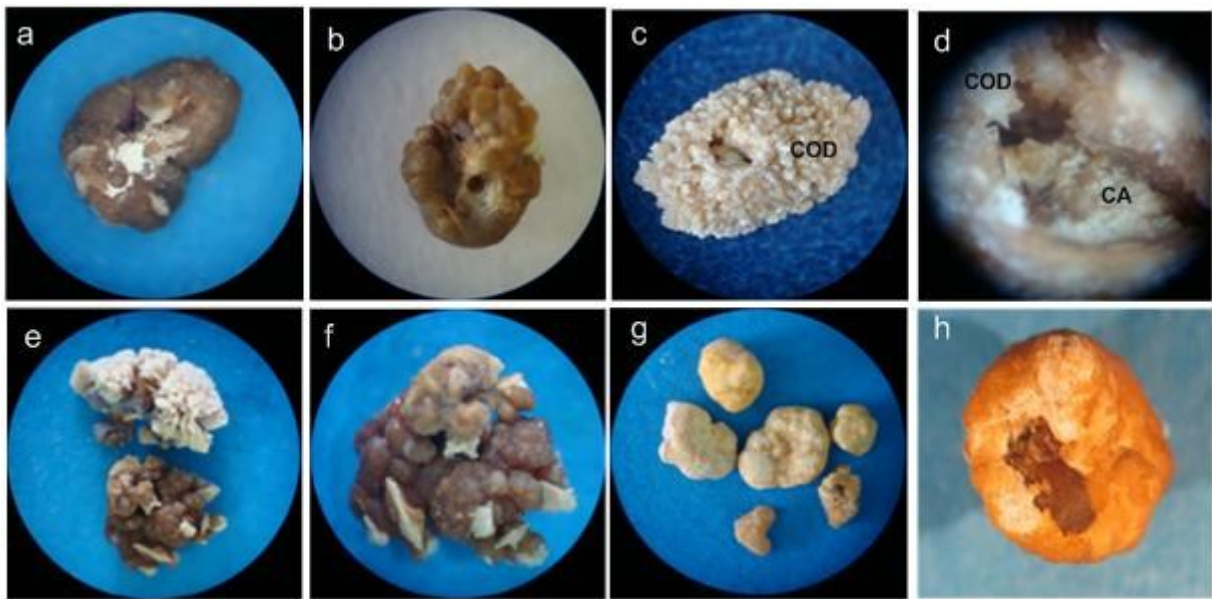


Figure 24 : Exemples de calculs ombiliqués

- Calcul d'oxalate de calcium monohydraté de type Ia ombiliqué présentant une plaque de Randall
- Calcul d'oxalate de calcium de type Ia ombiliqué sans plaque de Randall
- Calcul d'oxalate de calcium dihydraté de type IIa (COD) ombiliqué présentant une plaque de Randall
- Mise en évidence de la plaque de Randall présente sur le calcul de la Fig 24c
- Calculs ombiliqués d'oxalate de calcium de typage mixte Ia et IIa
- Mise en évidence de la plaque de Randall et de la conversion cristalline IIa vers Ia
- Calculs ombiliqués d'acide urique de type IIIb
- Calcul ombiliqué de composition mixte IIIb + Ia

II.3. Résultats

II.3.1. Prévalence des calculs formés sur PR

Notre étude porte sur 1067 calculs du haut appareil urinaire provenant de 681 hommes et 386 femmes dont 204 présentaient une ombilication papillaire (H : 142 ; F : 62). Ainsi, le taux global de cette lithogénèse est de 19.1% (20.9% chez l'homme et 16.1% chez la femme). Une répartition selon l'âge et le sexe des patients permet de constater que ce type de lithiase peut se manifester dès l'enfance et l'adolescence comme il peut constituer une cause non négligeable de lithiase rénale chez les sujets de plus de 60 ans (Tableau 20). La lithogénèse sur plaque de Randall représente plus d'un calcul sur cinq chez les jeunes adultes (de 20 à 30 ans) et presque un quart des calculs entre 30 et 50 ans.

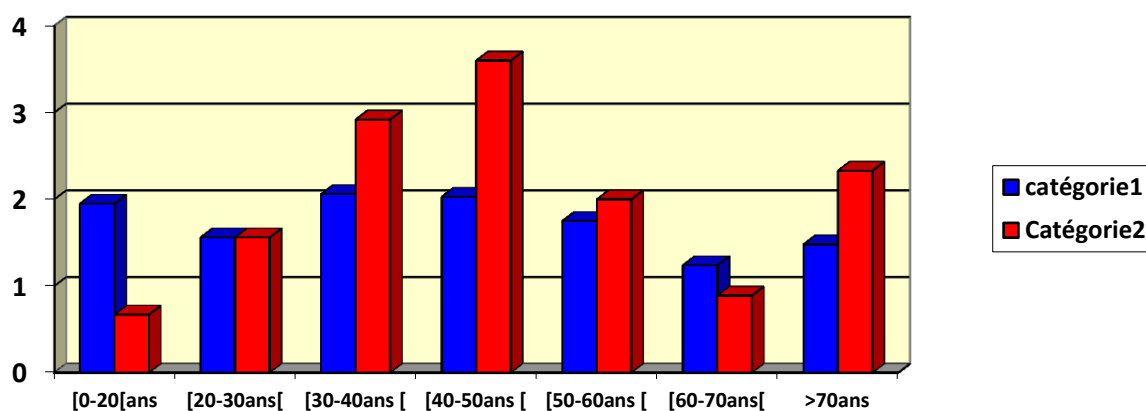
Tableau 20: Incidence des calculs rénaux ombiliqués et distribution selon l'âge et le sexe des patients

âge		0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	≥70 ans	Total
Homme	Global	26	17	67	144	175	140	78	34	681
	OxCal	2	10	52	110	144	105	56	22	501
	Cal_Omb	2		14	38	51	22	8	7	142
	%	4.7		20.9	26.4	29.1	15.7	10.3	20.6	20.9
Femme	Global	10	12	42	70	86	80	63	23	386
	OxCal	5	7	23	41	54	44	37	13	224
	Cal_Omb	3		9	13	14	11	9	3	62
	%	13.6		21.4	18.6	16.3	13.8	14.3	13.0	16.1
Total	Global	36	29	109	214	261	220	141	57	1067
	OxCal	7	17	75	151	198	149	93	35	725
	Cal_Omb	5		23	51	65	33	17	10	204
	%	7.7		21.1	23.8	24.9	15.0	12.1	17.5	19.1

Cal_Omb : Calculs ombiliqués ; F = femmes ; H = hommes

II.3.2. Prédominance par sexe

La prédominance par sexe des patients vis-à-vis des calculs initiés sur PR, illustrée dans la Figure 25, a été estimée par la comparaison des ratios H/F de la population lithiasique globale (catégorie 1) et celle des patients ayant une lithiase d'origine papillaire (catégorie 2). Dans l'ensemble le ratio H/F est de 2.29 pour la catégorie 2 versus 1.76 pour l'ensemble des lithiasiques attestant ainsi une prédominance masculine pour ces lithiases formées sur plaque de Randall. Une répartition selon l'âge montre cependant que cette prédominance est beaucoup plus marquée entre 30 et 60 ans mais présente une tendance inverse pour les moins de 20 ans et les patients de 60 à 70 ans.

**Figure 25 :** Comparaison des Ratios H/F

Catégorie 1 : Population lithiasique globale

Catégorie 2 : Patients ayant une lithiase d'origine papillaire

II.3.3. Composition des plaques de Randall

Sur les 204 calculs ombiliqués, seulement 184 (90.2%) présentaient un résidu de plaque de Randall soit 17.2% des calculs de notre série. La composition des plaques, rapportée dans le Tableau 21, montre que les phosphates de calcium prédominaient avec une fréquence d'environ 96%. La carboxatite était, de loin, le phosphate de calcium le plus répandu, identifié comme constituant unique dans plus de 84 % des plaques, mais aussi observé en association avec d'autres phosphates de calcium dont le phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) et, à un moindre degré, la whitlockite (WK). L'association CA+PACC représentait globalement une fréquence de 10.9% (Femmes : 15.2 % vs Hommes : 8.8%). L'urate acide de sodium monohydraté, a également été identifié dans les plaques de Randall, soit pure avec une fréquence de 3.3%, soit en association avec la carboxatite avec une fréquence de 1.1%.

Tableau 21 : Composition des PR

Composition PR	Femmes			Hommes			Total		
	nb	%	% avec PR	nb	%	% avec PR	nb	%	% avec PR
Absence de PR	3	4.8	0	17	12	0	20	9.8	0
CA	48	77.4	81.4	107	75.4	85.6	155	76	84.2
CA+PACC	9	14.5	15.2	11	7.7	8.8	20	9.8	10.9
UrNa	2	3.2	3.4	4	2.8	3.2	6	2.9	3.3
CA+UrNa	0	0	0	2	1.4	1.6	2	1	1.1
CA+WK	0	0	0	1	0.7	0.8	1	0.49	0.54

II.3.4. Composition des calculs

La composition prépondérante des calculs ombiliqués est indiquée dans le Tableau 22. Il ressort que dans plus de 55% des cas, la composition était mixte (hors plaque de Randall) avec une nette prédominance de l'association d'oxalates de calcium mono et dihydraté (C1 + C2) relevée dans 49.5% des cas. Comme constituant unique, l'oxalate de calcium monohydraté (Whewellite : C1) représentait cependant 37.7% des calculs ombiliqués alors que sa forme dihydratée (Weddellite : C2) ne comptait que pour 3.9% des cas. L'association C1+C2 était prépondérante dans les deux sexes sans différence entre hommes et femmes alors que la whewellite était plus fréquente chez l'homme (H : 44.4% versus F : 22.6%).

Tableau 22 : Composition des calculs ombiliqués

Composition	Femmes		Hommes		Total	
	nb	%	nb	%	nb	%
C1	14	22.6	63	44.4	77	37.7
C2	3	4.8	5	3.5	8	3.9
AU	1	1.6	2	1.4	3	1.5
C1+C2	36	58.1	65	45.8	101	49.5
C1+AU	3	4.8	3	2.1	6	2.9
C1+UrAm	3	4.8	2	1.4	5	2.5
C2+CA	1	1.6	0	0	1	0.5
C1+C2+AU	1	1.6	1	0.7	2	1.0
C1+C2+CA	0	0	1	0.7	1	0.5
Total	62	100	142	100	204	100

Dans le Tableau 23 sont indiquées les fréquences des différents constituants dans ces calculs et celles des constituants qui y sont majoritaires. Dans l'ordre décroissant, le C1 était présent dans 94.1% des calculs et représentait le constituant majoritaire dans 75.9% des cas. Il était suivi du C2 présent dans plus de la moitié des calculs et majoritaire dans 20.6% d'entre eux. L'acide urique et l'urate d'ammonium, dont les fréquences respectives étaient de 5.4 et 2.5%, n'étaient majoritaires que dans 2.9 et 0.5% des calculs respectivement.

Tableau 23 : Fréquence des constituants (présence et majoritaire) dans les calculs ombiliqués

Constituants	Femmes				Hommes				Total			
	présence		majoritaire		présence		majoritaire		présence		majoritaire	
	nbr	%	nbr	%	nbr	%	nbr	%	nbr	%	nbr	%
C1	57	91.9	48	77.4	135	95.1	107	74.8	192	94.1	155	75.9
C2	45	66.1	13	21.0	72	50.7	29	20.4	117	57.4	42	20.6
AU	5	8.1	1	1.6	6	4.2	5	3.5	11	5.4	6	2.9
UrAm	3	4.8	0	0	2	2.1	1	0.7	5	2.5	1	0.5
total			62	100			142	100			204	100

Après avoir constaté que la majorité des calculs initiés sur une plaque de Randall présentaient une composition majoritaire en composants oxalocalciques (96.5%), nous avons estimé la proportion des calculs oxalocalciques formés sur plaque de Randall par rapport à l'ensemble des calculs majoritaires en oxalate de calcium (Fig. 26). Dans l'ensemble, les calculs ombiliqués représentaient plus de 28% des calculs oxalocalciques à égalité entre sexes (H : 28.3 % et F : 27.7%). La répartition selon l'âge et le sexe des patients, représentée dans la

Figure 26, révèle des proportions importantes de ce type de calculs chez les jeunes adultes de 20 à 30 ans, notamment chez la femme (39.1% vs 26.9% chez l'homme). Chez les hommes, les calculs ombiliqués sur plaque de Randall représentent environ 35% entre 30 et 50 ans.

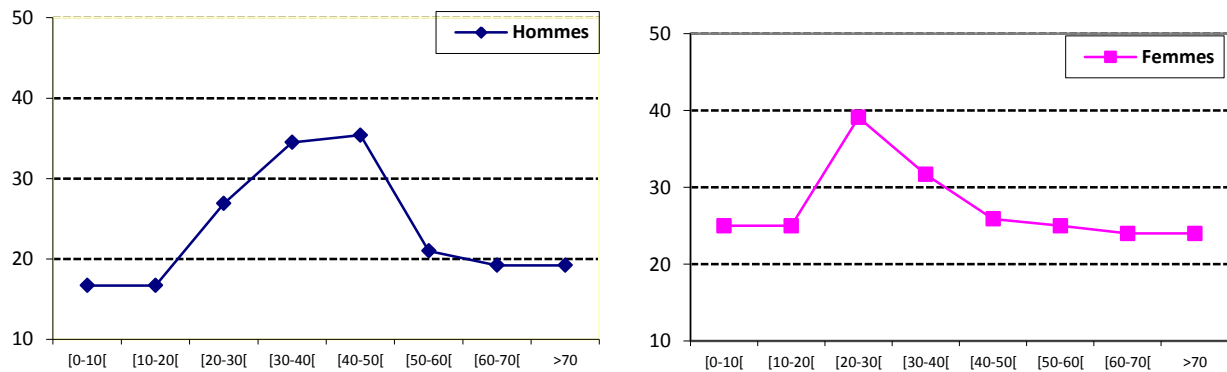


Figure 26 : Proportions des calculs oxalocalciques développés sur une plaque de Randall par rapport à l'ensemble des calculs oxalocalciques majoritaires selon l'âge et le sexe des patients

II.4. Discussion

➤ *Epidémiologie et prévalence*

L'intérêt porté depuis une vingtaine d'année à l'étude de la formation des calculs rénaux à partir d'une plaque de Randall est en rapport avec plusieurs facteurs dont une incidence croissante de cette lithogénèse, une population jeune de plus en plus touchée et une avancée considérable des moyens de diagnostic, notamment grâce au développement de l'urétéro-réno-scopie souple. Une synergie s'en est alors suivie pour éclaircir les différents aspects épidémiologiques et physiopathologiques en rapport avec ce type de pathologie lithiasique (Cifuentes-Delatte *et al*, 1985 ; Matlaga *et al*, 2006 ; Daudon *et al*, 2007 ; Khan *et al*, 2012). Dans ce contexte, notre étude est la première en Algérie à s'intéresser spécifiquement aux calculs urinaires formés à partir d'une plaque de Randall. Réalisée à partir de calculs collectés au niveau des centres hospitaliers de la région Est- Algérien, elle a permis d'évaluer la fréquence de ce type de lithogénèse, contribuant ainsi à une étude plus élargie de la lithiase urinaire en Algérie.

Selon les résultats de notre étude, les calculs ombiliqués représentaient 19.1% des calculs du haut appareil urinaire dont 90.2% présentaient une plaque de Randall avec une légère prédominance masculine (Hommes : 20.9% versus Femmes : 16.1%). Cette forme de lithiase se manifeste dès l'enfance et l'adolescence et augmente de prévalence chez les jeunes adultes pour atteindre des proportions maximales entre 20 et 30 ans chez la femme et entre 30 et 50 ans chez l'homme. Ces résultats rejoignent ceux obtenus dans certains pays

industrialisés depuis les années 1980. En effet, [Cifuentes-Delatte et al. \(1985, 1987\)](#) ont observé une ombilication papillaire dans 142 calculs d'une série de 500 calculs expulsés spontanément, soit une proportion de 28.4%, alors qu'une analyse plus détaillée de 87 calculs ombiliqués a révélé la présence d'une plaque de Randall dans 72.4% des cas. Cependant, nos résultats se rapprochent davantage de ceux enregistrés en France par [Daudon et al](#) sur une série de 45 774 calculs avec une proportion de 19.5% de calculs ombiliqués dont 91% présentaient une plaque de Randall. Dans cette étude, les calculs ombiliqués étaient également plus fréquents chez les hommes (21.5%) que chez les femmes (14.7%) ([Daudon et al, 2007](#)).

L'incidence élevée de cette lithogénèse a été mise en évidence aux Etats-Unis suite aux différents travaux effectués depuis les premières observations de Randall. Dans sa fameuse série de 1154 paires de reins disséqués, Randall a identifié des calcifications sub-épithéliales dans 20% des cas et observé la présence de petits calculs oxalocalciques accrochés à ces calcifications dans 5.5% des cas ([Randall, 1936 ; Randall, 1940](#)). D'autres travaux réalisés au début des années 1940 ont révélé la présence de ce type de calcifications à des fréquences comprises entre 12% et 22.2% ([Rosenow et al, 1940 ; Anderson, 1940](#)). L'avènement et le développement de l'urétéroscopie souple, a permis de constater 60 années plus tard des fréquences beaucoup plus importantes de ces calcifications ectopiques, notamment chez les sujets lithiasiques, témoignant ainsi d'une croissance accrue de cette lithogénèse ([Low et al, 1997 ; Linnes et al, 2013](#)). En France, l'étude entreprise à partir d'une grande série de calculs rénaux sur l'évolution de la prévalence des calculs ombiliqués au cours des dernières décennies a montré que la fréquence de ce type de calculs, initialement de 10% entre 1978 et 1984, augmentait progressivement pour atteindre 22.2% entre 2000 et 2006 ([Daudon et al, 2007](#)), et même 50 à 60% des calculs recueillis au début de cette décennie chez les jeunes lithiasiques âgés de 20 à 30 ans ([Letavernier et al, 2015](#)).

➤ *Composition des plaques de Randall et des calculs ombiliqués*

La série étudiée présente 204 calculs ombiliqués dont 184 avec une plaque de Randall identifiée soit une fréquence de 17.2% de l'ensemble des calculs. La composition minérale de ces plaques est majoritaire en phosphate de calcium représenté exclusivement par trois composants dont la carapatite (CA), le phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) et la whitlockite (WK). La carapatite est cependant le composant prédominant en terme de fréquence (CA : 96.7%) et en tant que composant unique avec 84.2% des cas. Ces plaques peuvent également comporter, comme composant unique, de l'urate acide de sodium

monohydraté (UrNa : 3.3%) témoignant ainsi d'une hétérogénéité des processus intervenant dans leur formation.

La composition des calculs ombiliqués a été considérée selon la fréquence des associations entre composants lithiasiques, la fréquence de ces constituants et enfin leur présence en tant que constituant majoritaire. Cinq composants lithiasiques ont été mis en évidence, la whewellite et la weddellite pour les oxalates de calcium, la carapatite pour les phosphates de calcium, l'urate d'ammonium et l'acide urique pour les purines. Les oxalates de calcium étaient majoritaires dans 96,8% des calculs ombiliqués (C1 : 75.9% et C2 : 20.9%) et l'association C1+C2 représentait la moitié de ces calculs. En tant que constituant unique, la whewellite était de loin le composant le plus fréquent avec 37.7 % des calculs, suivie par la weddellite qui ne représentait que 3,9% des calculs ombiliqués, soit environ 10 fois moins que la whewellite.

La croissance des calculs initiés sur une plaque de Randall se caractérise par son hétérogénéité vis-à-vis du noyau phosphocalcique initiateur. En effet, l'oxalate de calcium, avec ses deux formes cristallines, est le constituant lithiasique qui prédomine largement dans la composition de ces calculs. Cela suppose que les conditions physico-chimiques ainsi que les facteurs métaboliques ayant conduit à la formation de la plaque de Randall sont différents de ceux qui sont responsables de la croissance du calcul au niveau de la papille rénale. Si, dans le cas de la plaque, plusieurs études suggèrent que l'hypercalciurie constitue la cause principale du processus de sa genèse ([Low et al, 1997](#) ; [Evan et al, 2003](#) ; [Evan AP et al 2008](#)) la croissance des calculs ombiliqués est cependant gouvernée par d'autres types d'anomalies métaboliques dont la principale semble être l'hyperoxalurie si l'on considère la forte prévalence des cristaux de whewellite autour de la plaque de Randall ([Daudon et al, 2016](#)). A partir des résultats que nous avons tirés de l'analyse IRTF de nos calculs, trois orientations se dégagent concernant leur étiologie:

- 1) Calculs formés uniquement de weddellite et dont l'hypercalciurie est la cause principale de croissance. Cette catégorie de calculs ombiliqués présente cependant une faible proportion.
- 2) Calculs formés de whewellite et de weddellite pour lesquels les deux étiologies, hyperoxalurie et hypercalciurie, de débit ou de concentration, sont vraisemblablement associées. Cette composition mixte est retrouvée dans une grande proportion de ces calculs (49.8% des cas).

- 3) Calculs formés uniquement de whewellite et dont l'hyperoxalurie, souvent de concentration, est la cause principale de croissance. La fréquence de ces calculs est relativement importante (38.1% des cas de notre série).

Les calculs formés sur une plaque de Randall représentent 28.1% des calculs majoritaires en oxalate de calcium de notre série sans différence entre les sexes. Cette proportion souligne l'importance de la pathogenèse liée à la plaque de Randall dans la formation des calculs oxalocalciques, qui sont de loin les plus fréquents aujourd'hui. Certains auteurs considèrent que ces plaques sont à l'origine de la plupart des calculs rénaux d'oxalate de calcium (Ohman *et al*, 1992 ; Kuo *et al*, 2003 ; Evan *et al*, 2008).

La répartition selon l'âge et le sexe des patients montre une proportion particulièrement élevée (39.1%) de calculs oxalocalciques initiés sur plaque de Randall chez les femmes lithiasiques de 20 à 30 ans. Une étude longitudinale réalisée en France par Letavernier *et al* sur trois périodes égales a révélé une inquiétante progression de la lithiase oxalocalcique initiée sur plaque de Randall (Letavernier *et al*, 2015). Cette croissance a été plus marquée pour les jeunes adultes de 20-30 ans et notamment chez les femmes de cette tranche d'âge où la proportion de ce type de calculs est passée de 17.2% durant la période 1989 -1991 à 59.2% vingt ans plus tard. Cette étude a mis l'accent sur la vitamine D comme l'une des causes responsables de la formation des calculs oxalocalciques sur plaque de Randall notamment pour des sujets génétiquement prédisposés. La nouvelle tendance qui consiste à prescrire des suppléments systématiques en vitamine D chez les enfants et les adolescents pourrait expliquer cette évolution épidémiologique marquée par une progression de calculs développés sur plaques de Randall chez des sujets de plus en plus jeunes.

A titre comparatif, les résultats de notre étude correspondent à ceux rapportés en France sur la période 1999-2001 (Letavernier *et al*, 2015). Dans le cas des jeunes adultes, on a constaté des proportions assez élevées avec une tendance plus marquée pour les femmes dont les calculs initiés sur une plaque de Randall présentent 43.5% des calculs oxalocalciques majoritaires. L'Algérie qui est un pays connu pour ses longues périodes de chaleur, même sur ses régions Nord, dispose d'une source naturelle de vitamine D à longueur d'année (environ 2600 heures/an d'ensoleillement). Paradoxalement, et selon une étude établie sur des adolescents scolarisés d'une localité du Nord Algérien, ont relève plutôt une carence en vitamine D sur la base des nouvelles normes en vigueur (Sokhal, 2015). De ce fait, les adolescents constituent une population justifiant une supplémentation en vitamine D et une consommation plus importante de produits calciques. Dans le cas des femmes, la justification d'une supplémentation en vitamine D-calcium est encore renforcée à l'adolescence en

prévision des risques de déminéralisation lors des grossesses et d'ostéoporose à la ménopause. Localement, il y a de fortes disparités en fonction de l'intérêt des praticiens pour la vitamine D bien que, dans l'ensemble, la prescription de vitamine D-calcium pour les adolescents s'affiche comme une nouvelle tendance pour ses multiples bienfaits présumés et sa non toxicité apparente. Cependant cette prescription échappe à tout moyen de contrôle et de suivi (notamment pas de surveillance de la calciurie) et les doses généralement prescrites sont celles préétablies dans des pays occidentaux, notamment en France, où l'ensoleillement n'est pas le même, ce qui peut être inadapté à la population locale. Aujourd'hui, les bénéfices de cette supplémentation systématique en vitamine D sont de plus en plus remis en question ([Kahwati et al, 2018](#)) alors que l'impact sur la lithogénèse est de plus en plus apparent ([Johri et al, 2017](#) ; [US Preventive Services Task Force et al, 2018](#)). Cette supplémentation en vitamine D-calcium pendant l'enfance et l'adolescence pourrait expliquer la constitution très précoce de plaques de Randall qui sont à l'origine de calculs oxalocalciques chez des adultes de plus en plus jeunes.

II.5. Conclusion

Les préoccupations en rapport avec l'incidence croissante de la lithiase oxalocalcique initiée sur une plaque de Randall dans les pays industrialisés ont suscité notre intérêt à évaluer ce type de pathogénèse au niveau de la région de l'Est Algérien. A partir d'une cohorte de 1067 cas de lithiase rénale, nous avons constaté que ce type de lithogénèse représente 20.9% des calculs avec une fréquence qui semble un peu plus prononcée chez les hommes (H : 20.9% versus F : 16.1%). La carbapatite est le principal composant des plaques de Randall avec une fréquence de 96.7%. Elle en est le composant unique dans 84.2% des cas, mais on la retrouve associée à du phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) ou de la whitlockite (WK) dans 11.4% des cas. Certaines plaques contiennent de l'urate de sodium. Les calculs formés sur plaque de Randall sont essentiellement composés d'oxalate de calcium. On a relevé aussi que 28.1% des calculs rénaux oxalocalciques, sans distinction entre sexe, étaient initiés sur une plaque de Randall et que cette proportion est encore plus élevée chez les femmes lithiasiques de 20-30 ans. Les résultats de cette étude convergent assez bien avec ceux des pays industrialisés et indiquent que l'évolution de cette pathologie dans un pays en voie de développement comme l'Algérie sera très probablement comparable à celle enregistrée dans ces pays.

Partie III

Etude des cas cliniques d'hyperoxalurie primaire

III- Etude des cas cliniques d'hyperoxalurie primaire

III.1. Introduction

L'évaluation métabolique chez tout patient lithiasique est aujourd'hui une nécessité universelle (Zilberman *et al*, 2009). Elle a sa place après le premier événement lithiasique pour s'étaler pendant le suivi afin d'identifier, dans l'ensemble, les différents dysfonctionnements métaboliques et/ou les facteurs lithogènes intervenant dans la production des calculs. Finalement, et sur la base des résultats dégagés, les corrections appropriées sont proposées pour éviter la récurrence lithiasique (CLAFU, 1996 ; Traxer *et al*, 2008).

L'exploration biologique des facteurs de risques de la maladie lithiasique doit être réalisée, en externe (en dehors d'une hospitalisation), dans les conditions habituelles d'activité, d'alimentation et de boissons du patient. Idéalement, le bilan métabolique est guidé par les résultats de l'analyse morpho-constitutionnelle du calcul (Straub *et al*, 2005 ; Daudon *et al*, 2011) et s'établira six semaines après un épisode lithiasique (élimination spontanée du calcul) ou une intervention thérapeutique (Lifshitz *et al*, 1999 ; Tiselius *et al*, 2001).

III.2. Matériel et méthodes du bilan étiologique

Sur la base de l'analyse morpho-constitutionnelle des calculs urinaires, deux patients lithiasiques récidivants ont été retenus pour une étude plus exhaustive de leur cas clinique.

Les paramètres du bilan lithiasique de ces patients ont été recueillis sur une fiche de renseignements comportant :

- Patient : sexe et âge,
- Entretien : les antécédents personnels et familiaux, les circonstances de découverte, localisation et mode d'élimination du calcul,
- Données : Etablies par l'étude morpho-constitutionnelle du calcul selon le protocole développé précédemment,
- Bilan métabolique (urinaire): Etabli sur des urines de 24 heures et analysé au niveau d'un laboratoire de biologie médicale privé. Les analyses biologiques spécialisées (oxalurie, citraturie) ont été réalisées au laboratoire de la lithiase urinaire, du service des explorations fonctionnelles, hôpital Tenon, Paris, selon une méthode chromatographique ionique haute performance.
- Cristallurie : Analyse réalisée sur les premières urines du réveil (urine fraîche à jeun) recueillies dans un récipient stérile et conservées à température ambiante pour être examinées au laboratoire dans les 2 heures après miction. Une fois arrivées au laboratoire de biophysique (Faculté de médecine Annaba), ces urines ont été

homogénéisées par retournement. La quantité prélevée à l'aide d'une pipette pasteur est étalée sur cellule de Malassez et observée au microscope optique à polarisation- Olympus CX41- (Fig. 26). Une étude qualitative et quantitative de la cristallurie sera ainsi réalisée par :

- Identification du résidu urinaire (espèces cristallines et non cristallines),
- Détermination des faciès cristallins des espèces cristallines,
- Comptage des cristaux par espèce cristalline et mesure de leurs tailles moyenne,
- Calcul du volume cristallin global (le VCG) en $\mu\text{m}^3/\text{mm}^3$ d'urine



Figure 26 : Microscope à polarisation avec cellule de malassez et dispositif de photographie

III.3. Résultats

III.3.1. Cas lithiasique 1

- **Patient** : Fille de 4 ans
- **Interrogatoire** :
 - Localisation du calcul : rénale droite
 - Mode d'élimination : spontané (en 2 épisodes : 2^{ème} élimination séparée d'une semaine)
 - Antécédents familiaux: sœur de 3 ans lithiasique. Père ayant subi une néphrectomie pour carcinome urothélial
 - Consanguinité : positive
- Analyse morphologique du calcul (Tableau 24, Figure 27)
- Analyse infrarouge à transformée de Fourier (Tableau 24)
- Cristallurie (Tableau 26, Figure 29)
- Bilan urinaire (Tableau 28, Figure 31)

III.3.2. Cas lithiasique 2

- **Patient** : Garçon de 19 ans
- **Interrogatoire** :
 - Localisation du calcul : rénale bilatérale
 - Mode d'élimination : spontané
 - Antécédents familiaux: père décédé à cause d'une IR provoquée par l'hyperoxalurie primaire
 - Consanguinité : positive (Ces parents ont un lien de parenté direct)
- Analyse morphologique du calcul (Tableau 25, Figure 28)
- Analyse infrarouge à transformée de Fourier (Tableau 25)
- Cristallurie (Tableau 27, Figure 30)
- Bilan urinaire (Tableau 28, Figure 31)

Tableau 24: Analyse morpho-constitutionnelle des calculs du patient 1

Nombre d'éléments :		Dimensions (en mm) :	
3 éléments (1 ^{ère} élimination)		de 4x4x4x mm à 6x6x5 mm	
2 éléments (2 ^{ème} élimination)		de 3x3x3 mm à 6x5x4 mm	
1 ^{ère} ELIMINATION			
Aspect global		Caractéristiques morphologiques	
- Forme : +/- arrondie bosselée		- Surface : Mamelonnée + dépôt gras	
- Couleur : Brun foncé (partie blanchâtre)		- Section : Concentrique radiale	
- Dureté : +++		- Noyau : microcristallin blanchâtre	
Typage morphologique		Spectrophotométrie Infrarouge	
- Surface : Ia		- Surface : C1 + (prot peu)	
- Section : Ia		- Section : C1 + (prot peu)	
- Noyau : IVa1 + Ia		- Noyau : CA + C1+ (prot peu)	
Composition de la poudre globale			
Oxalate de calcium Monohydraté : C1: 92 %			
Carbonate Apatite : CA : 4 %			
Protéine : 4%			
Cause			
Hyperoxalurie de débit ou de concentration			
2 ^{ème} ELIMINATION			
Typage Morphologique		Spectrophotométrie Infrarouge	
Morphologie Ia et Ic			
Causes: Hyperoxalurie primaire			

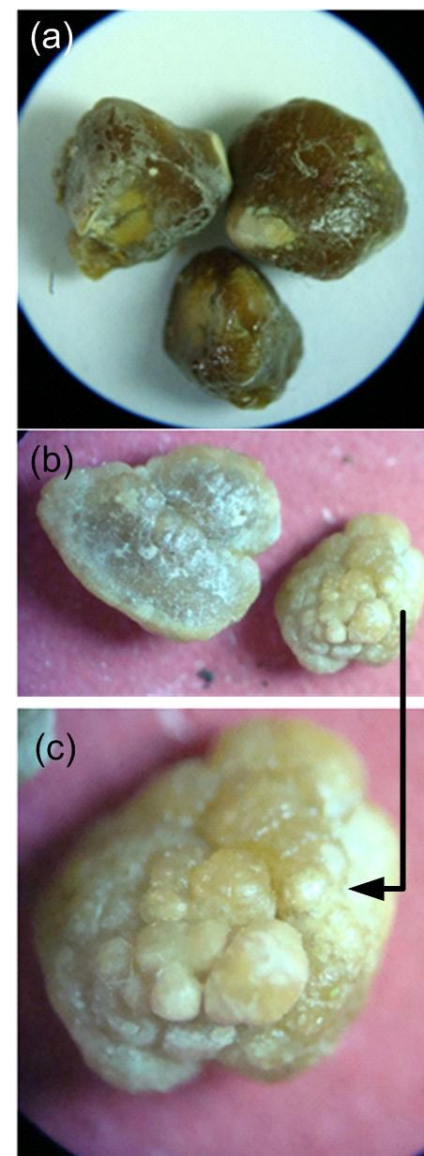


Figure 27: Calculs d'oxalate de calcium monohydraté de sous-types Ia (a) et Ic (b, c) observé sous microscope optique

- Calculs de la première élimination spontanée
- Calculs de la deuxième élimination spontanée
- Calculs de la deuxième élimination spontanée (mise en évidence de la morphologie Ic)

Tableau 25: Analyse morpho-constitutionnelle des calculs du patient 2

Nombre d'éléments : 5	Dimensions (en mm) : /
Aspect Global	Caractéristiques Morphologiques
<ul style="list-style-type: none"> - Forme : +/- arrondie - Couleur : brun / - Dureté : +++ 	<ul style="list-style-type: none"> - Surface : lisse / bourgeonnante - Section : concentrique / granuleuse - Noyau : concentrique/inorganisé
Typage Morphologique	Spectrophotométrie Infrarouge
<ul style="list-style-type: none"> - Surface : Id et Ic - Section : Id + Ia - Noyau : 	<ul style="list-style-type: none"> - Surface : C1 - Section : C1 + CA + Sucres - Noyau :
COMPOSITION DE LA POUDRE GLOBALE	
Oxalate de calcium Monohydraté : C1: 96%	
Sucre: 1%	
CA: 2%	
Prot: 1%	
C a u s e	
Hyperoxalurie majeure	

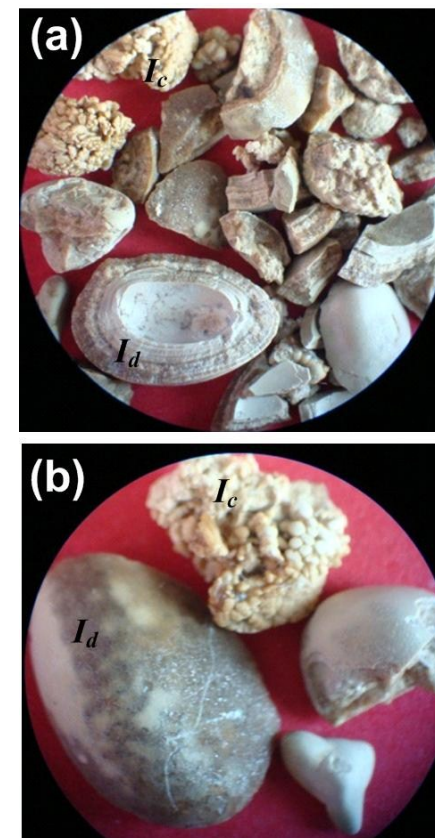


Figure 28: Calculs d'oxalate de calcium monohydraté (sous-types Id et Ic) observé sous microscope optique (a, b)

Tableau 26: Etude de la cristallurie des urines du réveil du patient1

Cristaux et faciès	Nombre /mm ³	Taille Ø µm	Agrégats	VCG µm ³ /mm ³	Interprétation
Cristaux de C1 Globulaire	600	2 à 12	+	39102	Hyperoxalurie primaire
Cristaux de C2 Octaédrique	30	7			
Cristaux de C3 (Caoxite)	2	18 à 16			

C1 : oxalate de calcium monohydraté
C2 : Oxalate de calcium dihydraté) octaédrique
VCG : Volume Cristallin Global calculé selon la formule : (VCG = Nx L³x0.19 : forme globulaire des cristallites de C1)

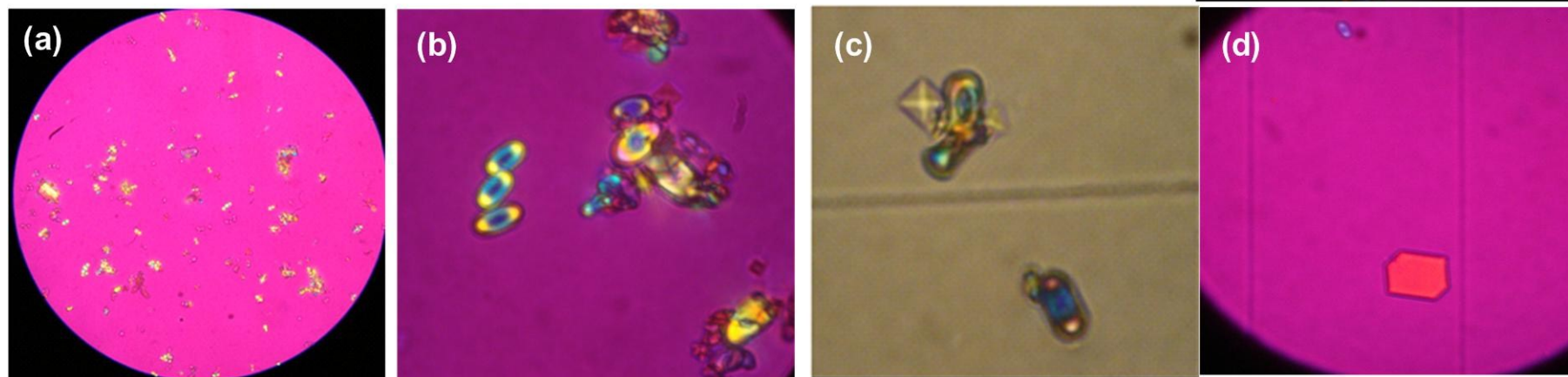
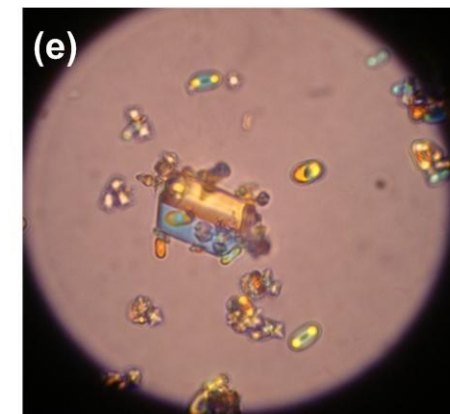


Figure 29: Cristallurie et mise en évidence d'une abondance des cristaux d'oxalate de calcium (a) de forme globulaire (Whewellite) individualisés et regroupés en agrégats (b) avec la présence de quelques cristaux bipyriformes de weddellite (c) et des cristaux à faciès pseudo-hexagonaux de caoxite (oxalate de calcium trihydraté) (d, e)

Tableau 27: Etude de la cristallurie des urines du réveil du patient 2

Cristaux et faciès	Nombre /mm ³	Taille Ø : µm	Agrégats	VCG* µm ³ /mm ³	Interprétation
Cristaux de C1	10000	2 à 3	+	29687	Hyperoxalurie primaire
Globulaire					
Cristaux de C3	10				
Pseudo-hexagonale					
C1 : oxalate de calcium monohydraté					
C2 : Oxalate de calcium dihydraté) octaédrique					
C3 : Caosite					
VCG : Volume Cristallin Global calculé selon la formule : (VCG = Nx L ³ x0.19 : forme globulaire des cristallites de C1)					

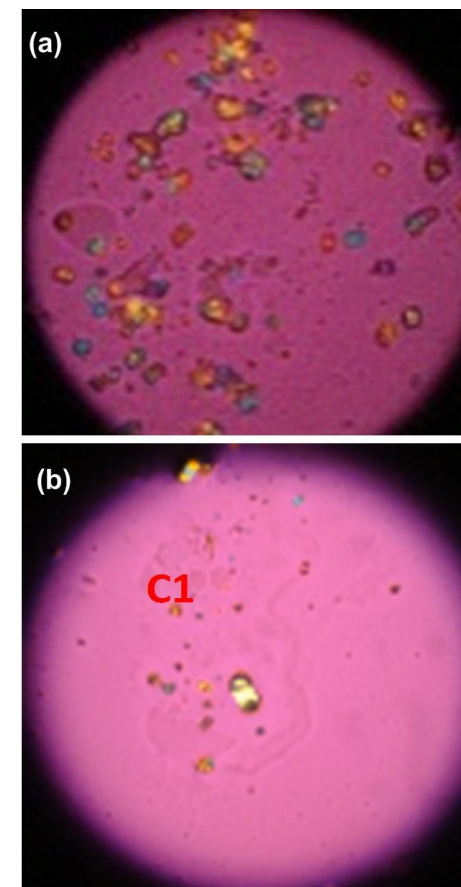


Figure 30: Cristallurie et mise en évidence d'une abondance des cristaux d'oxalate de calcium (a) de forme globulaire (Whewellite) individualisés et regroupés en agrégats (b)

Tableau 28: Résultats de l'analyse des urines de 24 heures des patients 1 et 2

Paramètres		Résultat		Zone de risque lithogène	Interprétation	
		Patient 1 (♀)	Patient 2 (♂)		Patient 1 (♀)	Patient 2 (♂)
Diurèse		0.48	2.5	<1.5 L/j	Pour un lithiasique il faut avoir une diurèse (> 3 l/j)	
Créatinine		3.458 mmol/l 1.66mmol/j	6.105 mmol/l 15.76 mmol/j	/	/	Diurèse de 24h
Oxalurie	de débit	0.311	1.872	> 0.45 mmol/j ♀ > 0.5 mmol/j ♂	/	Hyperoxalurie massive (>1mmol/j)
	de [cc]	0.648	0.624	> 0.3 mmol/l	Hyperoxalurie de [cc]	
Calciurie	de débit	2.581	2.22	> 6 mmol/j ♀ > 7 mmol/j ♂	/	/
	de [cc]	5.377	0.74	≥ 3.8 mmol/l	Hypercalciurie de [cc]	/
Citrate	de débit	0.407	0.425	< 1.5 mmol/j	Hypocitraturie de débit	
	de [cc]	0.848	0.170	≤ 1 mmol/l	Hypocitraturie de [cc]	
Magnésium	de débit	0.85	4.95	< 3.5 mmol/j ♀ <4 mmol/j ♂	Hypomagnésiurie de débit	/
	de [cc]	1.78	1.98	≤1.5 mmol/l	/	/
Ox/Creat		0.187	0.102	> 0.1	Hyperoxalurie I aire	
Ca/Citrate		6.34	4.35	> 3	Cristallisation oxalocalcique	
Ca/Mg		3.02	0.37	> 2	Cristallisation oxalocalcique	/
Calciurie/Oxalurie		8.32	1.19	/	/	
Calciurie x Oxalurie		3.49	0.46	/	/	
Zone de risque		7	2		Hyperoxalurie + hypercalciurie	Hyperoxalurie

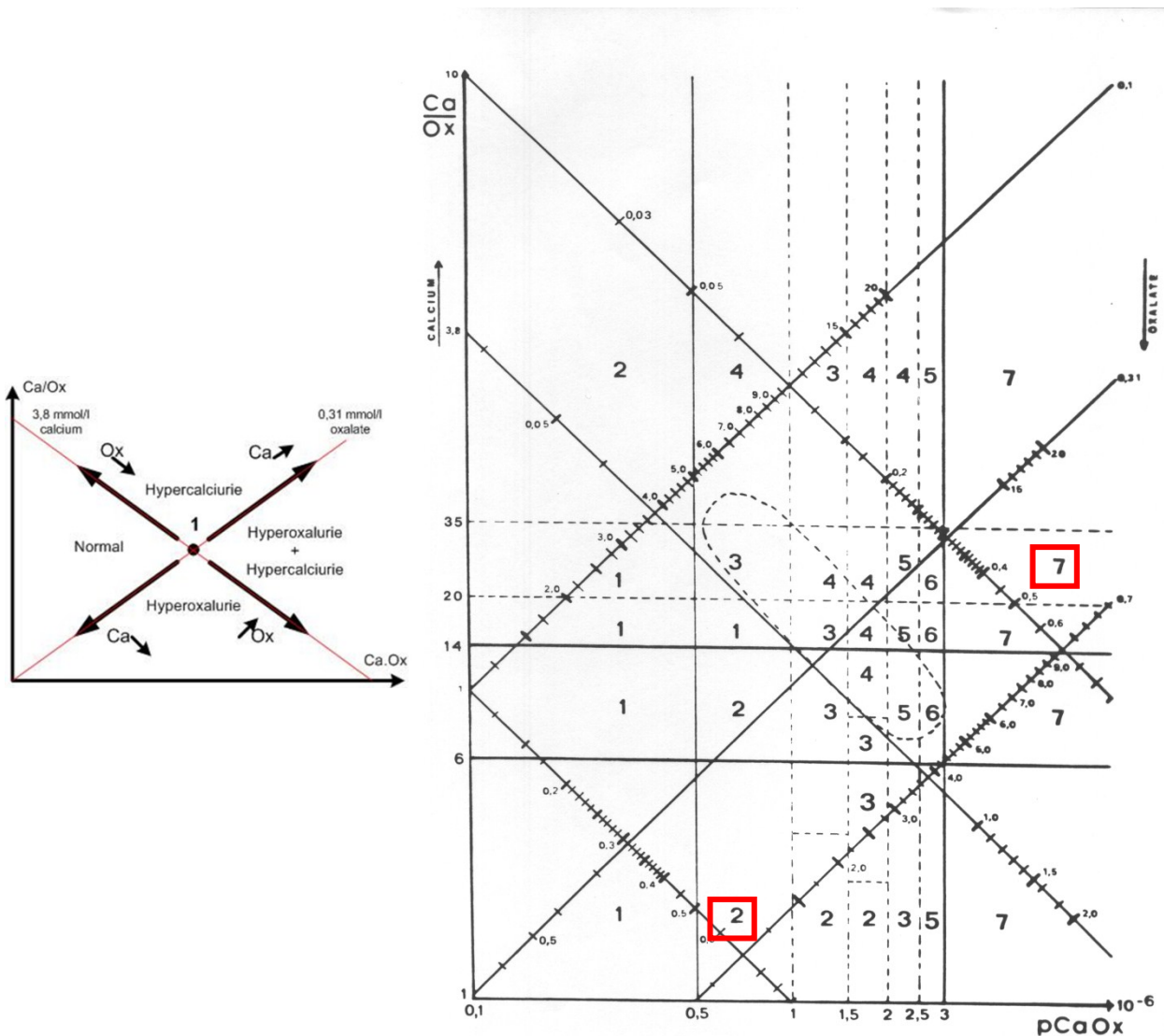


Figure 31 : Nomogramme de cristallisation oxalocalcique.

Détermination de la zone de risque cristalogène des cas cliniques 1 et 2

Les chiffres de 1 à 7 (indice cristallurique) indiquent un risque croissant de formation de cristaux d'oxalate de calcium, en fonction du produit molaire oxalocalcique et du rapport molaire calcium/oxalate. Les lignes obliques figurent les échelles de concentrations en calcium et en oxalate : lignes ascendantes pour les concentrations molaires croissantes de calcium (de 0,4 à 20 mmol), lignes descendantes pour les concentrations molaires croissantes d'oxalate (entre 0,03 et 2 mmol)

III.4. Discussion

L'hyperoxalurie est un trouble biochimique qui peut être la traduction d'une anomalie métabolique congénitale (hyperoxalurie primitive) ou la conséquence d'une pathologie acquise (hyperoxalurie secondaire) (Cochat *et al*, 2011).

L'hyperoxalurie primaire (HP) est essentiellement une affection du jeune enfant, même si quelques cas ne sont reconnus qu'à l'âge adulte. Bien que cette pathologie soit rare (1 naissance sur 120.000 en France) (Acquaviva-Bourdain *et al*, 2016) mais sa prise en charge est importante puisqu'elle peut provoquer une néphrocalcinose, et même une insuffisance rénale terminale, surtout dans les pays où la fréquence de consanguinité est élevée.

L'analyse morpho-constitutionnelle du calcul, l'étude de la cristallurie et l'analyse biochimique représentent une étape essentielle de l'approche diagnostic, permettant l'identification et la quantification des cristaux et des calculs, ainsi que les facteurs lithogènes

Dans notre série de 953 calculs urinaires, 54 lithiases de l'enfant et de l'adolescent ont été enregistrées (5.67% des cas) pour un ratio Garçon/Fille de 2.4. Cette fréquence, relativement faible comparativement à la fréquence de la lithiase de l'adulte, est proche de celle observée en Amérique du Nord où 2 % à 7 % des lithiases sont observées avant l'âge de 16 ans (Kliegman, 2000).

La lithiase oxalocalcique pour enfant et adolescent de notre série est présente avec une fréquence de 37% dont 5.56% orientent vers l'hyperoxalurie primaire. L'étude de cas clinique entreprise concerne deux cas de lithiase oxalocalcique dont le premier est une fille de 4 ans, ayant des antécédents familiaux (père : néphrectomie pour carcinome urétérale et sœur : 3ans lithiasique rénale) et de consanguinité positive. Le deuxième cas est un adolescent âgé de 19 ans, de consanguinité positive et lithiasique dès l'âge de 17 ans. Comme première approche ; la manifestation d'une lithiase urinaire oxalocalcique dès l'enfance ou l'adolescence est souvent révélatrice d'une maladie congénitale en rapport avec le métabolisme de l'oxalate induisant l'hyperoxalurie primaire. Le diagnostic de l'hyperoxalurie primaire chez ces deux cas a été révélé en premier par l'analyse morphologique de leurs calculs (expulsés spontanément). En effet, ces calculs ont une morphologie de sous-type Ic caractéristique de cette pathologie. Cette morphologie spécifique observée sous microscope optique est corrélée à un assemblage de cristallites très particulier, de couleur claire, d'une structure sphérique non homogène, lâche et d'un aspect bourgeonnant (Daudon *et al*, 2008). L'analyse infrarouge à transformée de Fourier a montré que ces cristallites agglomérées sont formées exclusivement de whewellite.

En plus des calculs d'oxalate de calcium monohydraté de sous-type Ic, un autre sous-type Ia de couleur brun foncé et de surface mamelonnée a été observé chez le patient 1, il se forme dans des contextes d'hyperoxalurie diététique ou d'hyperoxalurie de concentration par défaut de diurèse. Alors que le patient 2 a éliminé des calculs de surface lisse caractéristique de sous-type Id témoignant d'une stase urinaire ou confinement anatomique.

Suite à l'analyse morpho-constitutionnelle des calculs, un bilan urinaire a été réalisé pour confirmer le diagnostic d'HP en mettant en évidence les facteurs de risque impliqués dans le processus lithiasique.

L'analyse des urines de 24 heures a montré une forte hyperoxalurie (cas 1 : 0.648 mmol/l et cas 2 : 0.624 mmol/l) avec un ratio urinaire [oxalate/créatinine] supérieur à 0.1, sachant que la valeur normale de ce ratio selon l'âge est de 0.04 (maximum 0.08) chez l'enfant de 5 à 12 ans et 0.03 (maximum 0.07) pour les plus de 12 ans (Cochat *et al*, 2011). Ces résultats sont suffisants pour affirmer le diagnostic de l'HP.

A cette hyperoxalurie majeure, une hypercalciurie a été associée chez le patient 1 (5.39 mmol/l) alors que la calciurie chez le deuxième patient était dans les normes (0.74 mmol/l).

Le rapport des concentrations des deux promoteurs calcium et oxalate (Ca/Ox) joue un rôle primordial pour déterminer la phase cristalline (Daudon *et al*, 1985 ; Grases *et al*, 1990). Lorsque ce rapport faible (<5), favorise la précipitation de cristaux de whewellite (C1) plutôt que de weddellite (C2) (Monet *et al*, 2013). La cristallisation de C2 est possible en présence de celle de C1 dès que le rapport de concentrations Ca/Ox est supérieur à 6. Finalement la formation de C2 devient exclusive pour (Ca/Ox) supérieur à 14 (Daudon *et al*, 1985). Dans notre étude, ce rapport est de 8.32 (supérieur à 6) chez la fille et de 1.19 (inférieur à 5) chez le garçon.

Le dosage du couple calcium-oxalate nous a permis d'apprécier la situation des patients vis-à-vis de la zone de risque cristallogène afin de définir les mesures thérapeutiques permettant de s'écarter de la zone à haut risque et d'atteindre la zone à faible risque cristallogène.

On a déterminé graphiquement la zone de risque cristallogène des deux patients en reportant les concentrations mesurées en calcium et en oxalate urinaire sur le nomogramme de la Figure 31. Dans le cas de nos patients qui sont atteints d'une HP, dont la concentration de l'oxalate urinaire est très élevée, le risque lithogène dépend essentiellement de la calciurie, même si celle-ci est dans les normes. En effet, pour le patient 1, ayant une hyperoxalurie associée à une hypercalciurie et un produit molaire oxalocalcique (Ca.Ox) qui dépasse

$3(\text{mmol/l})^2$, était dans la zone de risque numéro 7 ce qui correspond au risque maximum. Quant au patient 2, avec une calciurie normale et $\text{Ca.Ox} = 0.46 (\text{mmol/l})^2$, il se trouve en zone d'indice de cristallisation égale à 2 qui représente un faible risque cristallogène. On remarque que la zone de risque cristallogène augmente avec le produit molaire (Ca.Ox). Pour cela, la première mesure thérapeutique à prendre pour minimiser le risque cristallogène est l'augmentation de la diurèse qui permet de passer de la zone de risque la plus élevée en une zone normale d'indice égale à 1, en diminuant le produit molaire oxalocalcique. Cette mesure n'est pas suffisante pour faire disparaître la cristallurie oxalocalcique car chez les deux patients la concentration de citrate est faible (patient 1: 0.848 et patient 2 : $0.170 < 1\text{mmol/l}$). En plus de l'effet lithogène de la calciurie, l'hypocitraturie, définie par un débit $< 1.5 \text{ mmol/j}$, joue un rôle important dans le processus lithogène oxalo-calcique urinaire. Le rôle majeur du citrate est lié à sa capacité à inhiber l'agrégation et la croissance des cristaux d'oxalate de calcium en se liant au calcium urinaire, empêchant ainsi ce dernier de se lier à l'oxalate et/ou au phosphate. L'hypocitraturie est constatée lors de faible volume urinaire, mais aussi lors d'hyperacidité urinaire d'origine diététique, résultant d'une consommation excessive de sel et/ou de protéines animales (Féraïlle, 2002). Par contre, une alimentation riche en fibres alimentaires ainsi qu'en potassium contenu particulièrement dans les fruits et légumes (surtout les agrumes comme le citron, l'orange...etc) augmente la citraturie.

Le rapport calciurie/citraturie est un bon indicateur du calcium urinaire potentiellement lithogène susceptible de se lier à l'oxalate faute d'avoir été complexé par le citrate. Chez les deux patients ce rapport est de 6.34 (patient 1) et 4.35 (patient 2) donc supérieur à 3 ce qui révèle pour les deux un risque lithogène avéré.

Tout comme le citrate urinaire, le magnésium urinaire inhibe la formation et la croissance des cristaux d'oxalate de calcium, en complexant l'oxalate sous forme d'oxalate de magnésium, très soluble, ce qui diminue la quantité d'ions oxalate disponible pour fixer le calcium et réduit la sursaturation en oxalate de calcium des urines (Fleisch, 1978 ; Hallson et al, 1982). Toutefois, cette action est faible si les concentrations en magnésium urinaire n'atteignent pas 4 à 6 mmol/l (Li, 1985) et cela est sans conséquence sur l'atténuation du risque de lithiase rénale. Nos patients 1 et 2 ont un taux respectif de magnésiurie de 1.78 et 1.98 mmol/l donc pas assez élevé pour inhiber la formation de calculs oxalocalciques

La cristallurie des urines est un excellent examen de suivi des patients lithiasiques, et dans le cas de patients porteurs de calculs, d'avoir une idée de la nature des lithiases. Elle doit être réalisée chez tout patient souffrant d'une forme héréditaire sévère de lithiase telle que cystinurie, hyperoxalurie primaire ou dihydroxyadéninurie pour en optimiser la prise en

charge thérapeutique. Dans la lithiase oxalocalcique, les formes cristallines, whewellite ou weddellite, orientent respectivement vers l'hyperoxalurie et l'hypercalciurie. Une quantité élevée de cristaux de whewellite traduit une forte hyperoxalurie et doit faire rechercher une hyperoxalurie primaire (Daudon *et al*, 2016).

L'étude de la cristallurie sur des urines matinales fraîchement émises de nos patients, confirme le diagnostic d'hyperoxalurie primaire, par la présence de cristaux de whewellite (C1 de forme globulaire) avec un nombre important excédant $200 /\text{mm}^3$ (cas 1 : $600/\text{mm}^3$ et $\text{Ø}_{\text{moy}} = 7\mu\text{m}$, cas 2 : $10000/\text{mm}^3$ de $\text{Ø}_{\text{moy}} = 2.5\mu\text{m}$) et un volume cristallin global supérieur à $1000 \mu\text{m}^3/\text{mm}^3$ (cas 1 : $39102 \mu\text{m}^3/\text{mm}^3$, cas 2 : $29687 \mu\text{m}^3/\text{mm}^3$) ce qui révèle une hyperoxalurie avérée pour les deux patients. Cependant, pour le patient 1, en plus des cristaux de C1, on a observé des cristaux de C2 ($30/\text{mm}^3$) ne pouvant donc se cristalliser que dans des conditions d'hypercalciurie associée.

En outre, on a remarqué la présence de quelques cristaux de C3 (Caoxite : oxalate de calcium trihydraté) de forme pseudo-hexagonale dans les urines des deux patients (patient 1 : 2 cristaux et patient 2 : 10 cristaux/ mm^3) ce qui renforce le diagnostic orientant vers l'hyperoxalurie primaire. Cette forme cristalline, oxalate dépendante, est très instable et se convertit rapidement en whewellite (en 80h à 25°C et en 4h à 37°C) (Doremus *et al*, 1976), elle ne peut de ce fait être observée que lors de l'analyse de la cristallurie.

A partir des résultats obtenus du bilan urinaire ainsi que de la cristallurie, on peut dégager dans le cas du premier patient une hyperoxalurie associée à une hypercalciurie avec présence de C1+C2+C3 dans les urines du réveil, mais juste une hyperoxalurie chez le deuxième patient dont la cristallurie est riche en C1 et C3, deux espèces cristallines oxalate dépendantes.

L'analyse morpho-constitutionnelle des calculs du patient 1 n'a pas révélé la présence de C2, qui est cristallisé dans des conditions d'hypercalciurie puis s'est déshydraté en C1. Cette conversion est importante dans les calculs qui séjournent plus longtemps dans l'arbre urinaire car elle modifie leur structure comme dans notre cas où on a observé uniquement le sous type Ia. C'est l'analyse urinaire et la cristallurie qui nous ont permis de mettre en évidence cette hypercalciurie donc il est important de faire une exploration biologique complète comprenant les trois types d'analyse morpho-constitutionnelle, bilan urinaire et la cristallurie.

Ces derniers permettent le diagnostic précoce d'une lithiase congénitale en se basant en premier lieu sur l'âge des patients (< 30 ans), et de déterminer les facteurs de risque pour

mettre une stratégie thérapeutique afin de prévenir la récurrence et l'apparition des complications.

III.5. Conclusion

Dans la présente étude on a considéré des cas cliniques sur la base de l'analyse morphologique des calculs urinaires des patients. En effet, l'analyse de ces calculs orientait vers une étiologie congénitale qui est l'hyperoxalurie primaire. Il s'en est suivi l'analyse de la cristallurie des patients concernés qui a fortement appuyé cette tendance d'hyperoxalurie primaire. Les indices ainsi relevés par la cristallurie sont : la présence d'une forme rare d'oxalate de calcium (Oxalate de calcium trihydraté: C3), un nombre important des cristaux C1 de VCG trop élevé. L'analyse biologique, quant à elle, a dégagé les facteurs de risques responsables de la formation de ces calculs urinaires.

Cette étude confirme l'importance de l'analyse morphologique des calculs, par loupe binoculaire, comme première approche dans le protocole de prise en charge des patients lithiasiques. Son impact est d'autant plus important pour les sujets présentant une maladie congénitale. L'identification précoce (dès le 1^{er} épisode lithiasique) d'une maladie héréditaire par l'analyse morphologique est essentielle pour engager en temps opportun une prise en charge des patients afin de leur éviter la récurrence des calculs. En outre, il y a lieu d'instaurer rapidement des solutions thérapeutiques adaptées afin de ralentir ou d'éviter l'émergence de complications rénales. Enfin, ces analyses préliminaires (analyse du calcul et cristallurie) doivent être soutenues par l'analyse biologique pour confirmation de l'étiologie et la détermination des facteurs de risque lithiasique. Les résultats ainsi obtenus permettront un suivi approprié des patients lithiasiques en leur proposant des mesures thérapeutiques préventives efficaces.

Partie IV

***Etude des effets litholytique,
antioxydant et anti-
inflammatoire, in vitro des
racines de Leuzea conifera L***

IV.1. Etude phytochimique des racines de *Leuzea conifera* L

IV.1.1. Introduction

Appelée aussi « *Rhaponticum coniferum* », la *Leuzea conifera* est une espèce de plantes à fleurs de la famille des Astéracées (Tableau 29). Il s'agit principalement d'une plante méditerranéenne, répartie dans le Sud-Ouest de l'Europe (Portugal, Espagne, France, Italie), les Baléares, la Corse, la Sardaigne, la Sicile et l'Afrique du Nord-Ouest (Maroc, Algérie, Tunisie) (Peccenini, 1997), (Fig. 32) et elle pousse sur un sol rocailleux et calcaire.

L. conifera est une espèce herbacée vivace à tige de 5-60 cm simple et monocéphale faiblement ramifiée; qui se termine par un magnifique capitule solitaire (4cm de diamètre) à forme de pomme de pin très caractéristique, de couleur argentée (bractées luisantes et membraneuses). Ses fleurs purpurines apparaissent plus tardivement sous forme d'une aigrette de fleurons tubulés. La floraison a lieu de mai à juillet. Les feuilles (sauf les juvéniles) lyrées ou pennatipartites, blanches-tomenteuses en dessous, verdâtres-glabres en dessus. Les fruits à aigrette blanche au moins cinq fois plus longue que l'akène (Peccenini, 1997).

À notre connaissance, il n'existe pas à ce jour des études sur la phytochimie et les activités biologiques de *L. conifera*. Pour cela, nous avons envisagé de réaliser une étude phytochimique sur les racines de cette plante comportant, outre les tests phytochimiques, le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés) et la préparation de différents extraits (aqueux et organiques). Cela nous permettra par la suite d'évaluer, *in vitro*, leurs activités anti-lithiasique, antioxydante et anti-inflammatoire.

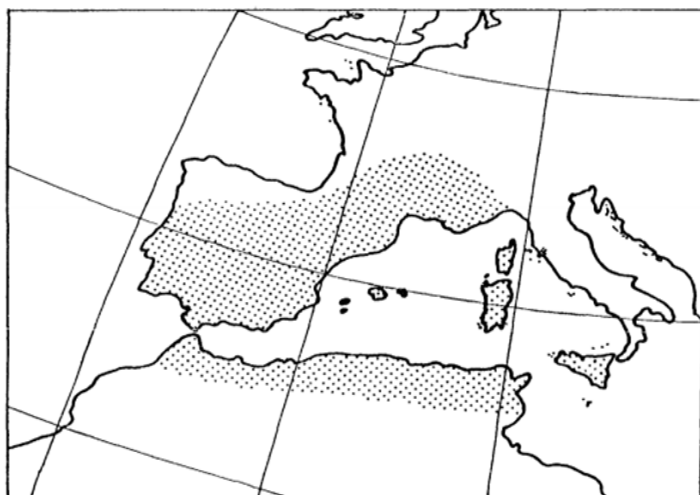


Figure 32 : Répartition géographique du *Leuzea conifera* (Peccenini, 1997)

Tableau 29: Position systématique de la plante *Leuzea confifera* (Cronquist, 1981)

Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Nom binominal	Non scientifique	Nom vernaculaire
Plantae	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Rhaponticum	Rhaponticum confiferum	Leuzea confifera	Leuzée à cône, Pomme-de-pin, Leuzée confifère

IV.1.2. Matériel et méthodes

IV.1.2.1- Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de racines de *L confifera*, de la région ‘‘El Battoum’’ commune ‘‘Taoura’’ wilaya de ‘‘Souk-Ahras’’ (Fig.33, 34). Cette plante a été achetée chez un herboriste à -Taoura-. Elle a été identifiée par A. CHEFROUR, Professeur en botanique à l’université de Souk Ahras. Les racines sèches ont été broyées en poudre fine utilisée par la suite pour la préparation des extraits.



Figure 33: Localisation géographique de *Leuzea confifera* (Google earth).

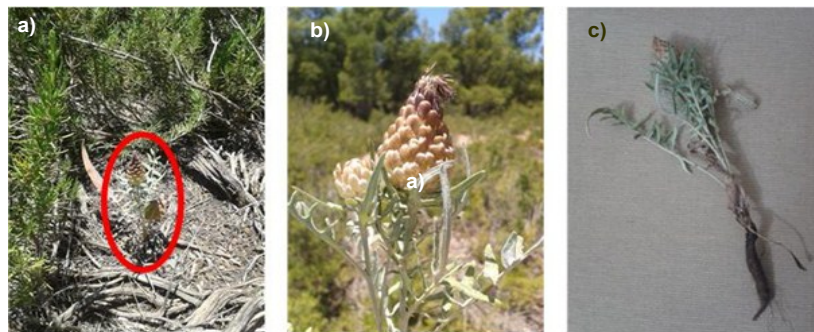


Figure 34 : *Leuzea confifera* [Photos prises par Lekouaghet,A., 2014].
Vue générale (a), mise en évidence des fleurs et des feuilles (b) et des racines (c).

IV.1.2.2. Tests de mise en évidence des principes actifs de *Leuzea conifera*

La phytochimie qualitative permet la mise en évidence des différentes familles de composés existants dans la partie étudiée de la plante. Elle consiste à l'établissement d'un protocole de réactions chimiques caractéristiques en utilisant notamment des réactifs spécifiques à chaque famille de composés (Bruneton, 1993).

- **Alcaloïdes**

Un échantillon de 10g de plante pulvérisée est macéré dans quelques millilitres de HCL dilué à 1% pendant 30 minutes. On filtre le mélange et on ajoute au filtrat récupéré le réactif de Mayer. L'apparition d'une solution trouble indique la présence d'alcaloïdes (Bouquet, 1972).

- **Flavonoïdes**

On macère 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCL dilué à 1% pendant 24 h. Après filtration, un volume de 10ml du filtrat est rendu basique par l'ajout de NH_4OH . L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure de tube à essai indique la présence de flavonoïdes (Okmu, 2005).

- **Tanins**

A 10g de poudre sèche on ajoute une solution aqueuse de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ à 1%. Après filtration, on teste le filtrat avec quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 . Un test positif (présence de tanins) est révélé par l'apparition d'une coloration verte (Karumi et al, 2004).

- **Stérols et terpènes**

On prend 5g de poudre sèche et on ajoute 210ml d'éther de pétrole. On filtre, on évapore puis on dissout le résidu obtenu dans 0.5ml d'acide acétique et ensuite dans 0.5ml de CHCl_3 . On transfère ensuite la solution dans un tube à essai et on ajoute 1ml de H_2SO_4 concentré. A la zone de contact des deux liquides, un cercle violet ou marron est formé puis devient gris, ceci indique la présence des stérols et terpènes (Dohou et al, 2003).

- **Saponosides**

On met 2g de la poudre sèche à l'ébullition avec 80ml d'eau distillée. Après avoir filtré et refroidi la solution, on agite le filtrat verticalement. L'apparition d'une mousse qui dure quelques instants indique la présence des saponines (Karumi et al, 2004).

- **Coumarines**

On met 1g de poudre végétale dans un tube à essai en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Le tube est ensuite recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain-marie pendant quelques minutes, puis on ajoute 0.5ml de NH_4OH dilué (10%) (Soulama et al, 2005).

IV.1.2.3. Dosage des éléments minéraux

La mesure de la concentration des éléments minéraux, contenus dans les racines de *L conifera*, a été réalisée, dans le laboratoire Horizon (Annaba), selon les méthodes suivantes :

- spectrophotométrie DIN 38406-E3, pour le calcium (Ca^{+2}) et le magnésium (Mg^{+2}),
- spectrophotométrie DIN EN ISO 6878-D11, pour l'ion phosphate (PO_4^-) l'orthophosphate (PO_4^{-3}) et le phosphate total (P),
- spectrophotométrie APHA 3500-ZnF, pour le zinc (Zn),
- spectrophotométrie méthode cuprizone, pour le cuivre (Cu),
- spectrophotométrie DIN 38 406-E1-1, pour le fer (F^{+3}),
- spectrophotométrie (SPADNS), pour le fluor (F^-),
- spectrophotométrie APHA 3500 ALD, pour l'aluminium (Al^{+3}),
- spectrophotométrie DIN EN ISO 7393 G4-2, pour le chrome (Cr^{+3}).

IV.1.2.4. Préparation des différents extraits à partir des racines de Leuzea conifera

IV.1.2.4.1. Extrait aqueux

Deux modes de préparation de l'extrait aqueux de *L conifera* ont été réalisés:

- macération, pendant 12 heures, de 20g de racines dans 200ml d'eau distillée,
- décoction en faisant bouillir 20g de racines dans 200ml d'eau distillée, pendant 20 min

A La fin de l'extraction, les extraits ont été récupérés, filtrés puis soumis à une évaporation sous vide (Rotavapor BUCHI, R 215) à 40°C.

IV.1.2.4.2. Extrait hydro-alcoolique

Une quantité de (136g) de matériel végétale pulvérisé, a subi une macération dans un mélange hydro-alcoolique (Ethanol/Eau : 80 : 20 : v/v) pendant 24h à température ambiante et sous agitation (agitateur magnétique de type VELP SCIENTIFICA. AM4). Cette opération a été répétée deux fois avec renouvellement du solvant durant 24 à 48 heures à chaque fois. Par la suite, L'extrait hydro-alcoolique a été filtré et concentré au rotavapeur à une température égale à 40°C, afin d'obtenir un extrait sec qui constitue notre extrait brut total. A cet extrait brut (rendement = 10.09%), on a ajouté de l'eau distillée et la solution aqueuse obtenue après filtration a subi une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol. Les trois fractions organiques récupérées sont concentrées et conservées au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur utilisation pour évaluer leurs activités anti-lithiasiques,

anti-oxydantes et anti-inflammatoires *in vitro*, ainsi que le dosage des principes actifs. La Figure 35, résume les étapes de fractionnement de l'extrait brut.

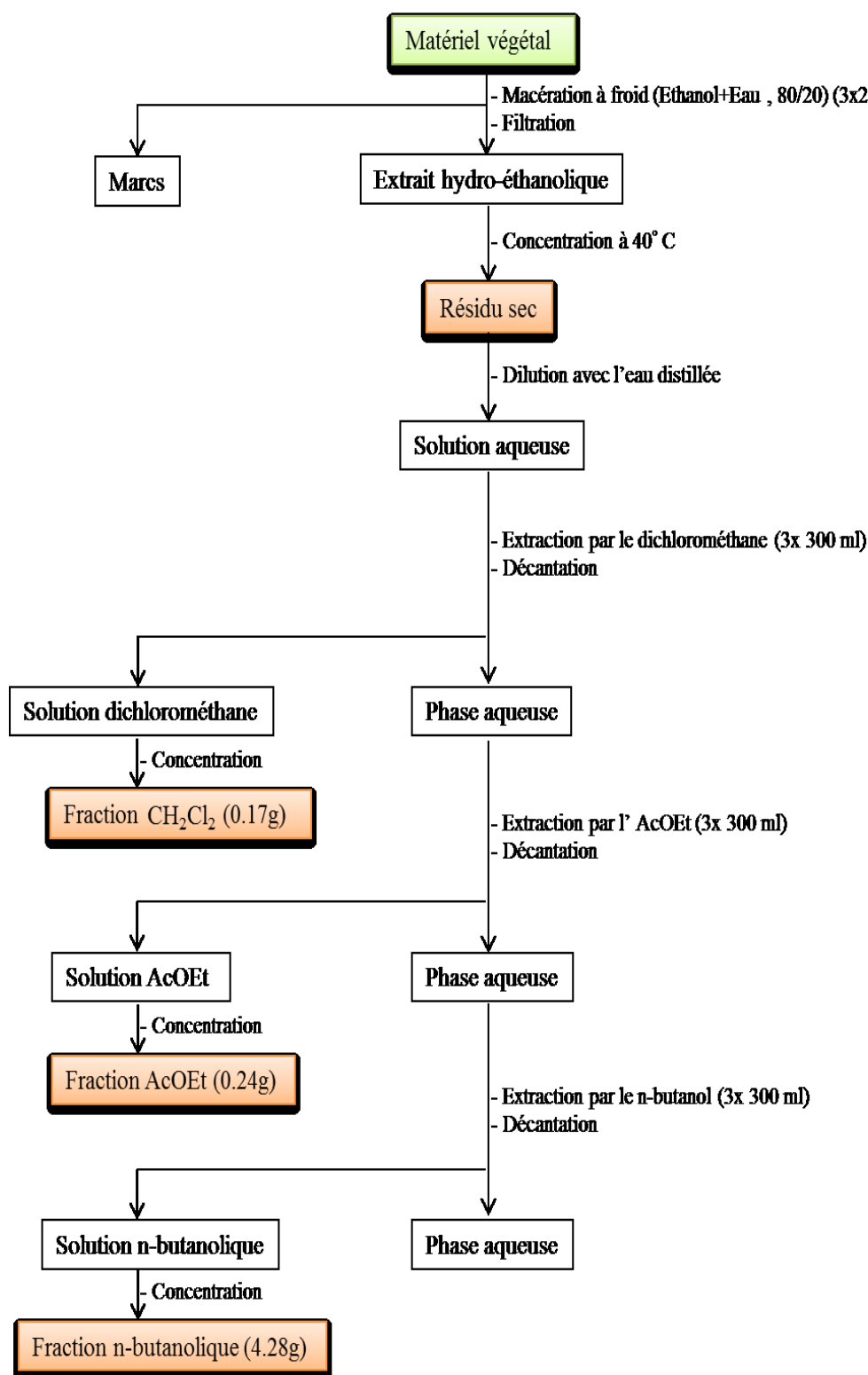


Figure 35 : Les étapes du fractionnement de l'extrait brut des racines de *Leuzea conifera*

IV.1.2.5. Dosage des composés phénoliques

IV.1.2.5.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux, des extraits de plantes, a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (FCR) (Singleton et Rossi, 1965) avec quelques modifications.

➤ **Principe**

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phospho-tungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phospho-molybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune, est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 750 -765 nm.

➤ **Mode opératoire**

A 20µl de chaque extrait est additionné 100µl de réactif FCR dilué (1 :10) et 75 µl de carbonate de sodium (7.5%). Après deux heures d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765nm par le lecteur de la microplaque (Perkin Elmer, Enspire), contre un blanc réalisé de la même manière en remplaçant l'échantillon par le méthanol ou l'eau distillée. Une courbe d'étalonnage de 0 à 200µg/ml est réalisée avec l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons (Annexe 04).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats obtenus sont exprimés en µg d'équivalent acide gallique par mg de la matière sèche d'extrait (µg EAG/mg).

IV.1.2.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode de Topçu et al. (2007) a été utilisée avec quelques modifications pour la détermination de la teneur en flavonoïdes.

➤ **Principe**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe jaunâtre formé entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Lagnika, 2005).

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 130 µl de méthanol est transféré dans une microplaque contenant 50µl de chaque extrait, puis 10µl d'acétate de potassium (CH_3COOK) (1M) et 10µl de nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) à 10% ont été ajoutés. Après 40 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 415nm par un lecteur microplaque (Perkin Elmer, Enspire). La concentration des flavonoïdes totaux a été calculée en utilisant la courbe

d'étalonnage réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (25-200 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon (Annexe 04).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en µg d'équivalent quercétine par mg de la matière sèche (µg/EQ/mg).

IV.1.2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée en utilisant le logiciel Minitab 16. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. La comparaison entre les différents groupes est effectuée après une analyse de la variance (ANOVA), les moyennes sont comparées 2 à 2 par test de Tukey.

Les différences sont considérées comme :

- significatives lorsque ($P \leq 0.05$).
- hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.01$).
- très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.001$). Avec P : Seuil de signification.

IV.1.3. Résultats

*IV.1.3.1. Principaux constituants chimiques des racines de *Leuzea conifera**

Les familles chimiques identifiées par le screening phytochimique préliminaire des racines de *L conifera*, sont présentées dans le Tableau 30. On note la présence des tanins condensés, des polyphénols, des flavonoïdes, des saponosides, des coumarines, des stéroïdes et terpènes, et absence des alcaloïdes et des tanins galliques.

Tableau 30 : Screening phytochimique des extraits aqueux de *Leuzea conifera*

Plante	Matériel végétal	Familles chimiques identifiées							
		Stéroïdes et terpènes	Polyphénols	Tanins		Flavonoïdes	Saponines	Coumarines	Alcaloïdes
				Galliques	Catéchiques				
<i>L. conifera</i>	Racines	+	+	-	+	+	+	+	-

(-) : Absence ; (+) : Présence

IV.1.3.2. Dosage des éléments minéraux

Les concentrations des minéraux sont montrées dans le Tableau 31. Le calcium, le magnésium et l'orthophosphate sont présents en quantité importante dans les racines de *L conifera* par rapport aux autres éléments. Les ions phosphates, le fluor et le phosphate total se trouvent en quantité modérée.

Tableau 31: Constituants minéraux présents dans les racines de *Leuzea conifera*

Elément	Concentration (mg/kg)
Calcium (Ca ⁺²)	2677
Magnésium (Mg ⁺²)	975
Orthophosphate (PO ₄ ⁻³)	265.5
Ion phosphate (PO ₄ ⁻)	87.97
Fluor (F ⁻)	72
Phosphate total (P)	71.6
Zinc (Zn)	4.8
Aluminium (Al ⁺³)	2.08
Cuivre (Cu)	0.96
Fer (Fe ⁺³)	0.96
Chrome (Cr ⁺³)	0.32

IV.1.3.3. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux

Les données relatives à la composition en métabolites secondaires, des extraits des racines de *L conifera* sont résumées dans le Tableau 32.

Les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux sont exprimés respectivement en µg EAG/mg et µg EQ/mg d'extrait, en se référant à la courbe d'étalonnage préalablement établie (polyphénols totaux: $y = 0.0034x + 0.1044$, $R^2 = 0.9972$; flavonoïdes totaux: $y = 0.0048x$, $R^2 = 0.997$) (Voir annexe 4).

Nos résultats montrent que la plante est riche en polyphénols avec une teneur qui varie entre 62.14 ± 0.35 et 344.98 ± 0.28 µg EAG/mg d'extrait. On remarque que la fraction d'acétate d'éthyle renferme la concentration la plus élevée en polyphénols par rapport aux autres extraits/fractions.

Quant aux flavonoïdes totaux, la fraction acétate d'éthyle donne la teneur la plus élevée (186.94 ± 0.33 µg EQ/mg) par rapport aux autres extraits/fractions, suivi par la fraction dichlorométhane avec une teneur de 116.67 ± 0.29 µg EQ/mg d'extrait.

Tableau 32 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des différents extraits/fractions des racines de *Leuzea conifera*

Extrait/fraction	Phenols totaux ($\mu\text{g EAG/mg}$) ⁽¹⁾	Flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mg}$) ⁽²⁾
Extrait brut	155.57 \pm 0.26 ^a	56.53 \pm 0.37 ^b
Dichloromethane	256.95 \pm 0.23 ^a	116.67 \pm 0.29 ^b
Acétate d'éthyle	344.98 \pm 0.28 ^a	186.94 \pm 0.33 ^b
Butanol	177.33 \pm 0.31 ^a	76.6 \pm 0.32 ^b
Macérât	62.14 \pm 0.35 ^a	10 \pm 0.19 ^b
Décocté	106.06 \pm 0.27 ^a	37.29 \pm 0.24 ^b

Résultats exprimés en moyenne \pm SEM

Test de Tukey: ^aP \leq 0.05 comparaison 2 à 2 pour les polyphénols totaux, ^bP \leq 0.05 comparaison 2 à 2 pour les flavonoïdes totaux.

(1) $\mu\text{g EAG/mg}$: microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

(2) $\mu\text{g EQ/mg}$: microgramme d'équivalent de la quercétine par milligramme d'extrait.

IV.1.4. Discussion

Plusieurs études ont été réalisées en se basant sur différentes techniques d'extraction et de révélation, pour déterminer les molécules bioactives des plantes comme dans ce travail, où l'attention est portée sur la plante *L. conifera*.

En premier lieu, une étude phytochimique qualitative a été réalisée pour identifier les grandes familles de métabolites secondaires existants dans les racines de la plante étudiée selon des méthodes classiques de caractérisation et d'identification. Ce screening phytochimique met en évidence la présence de différents composés chimiques qui possèdent des activités biologiques intéressantes, telles que l'action astringente des tanins, effet anti-inflammatoire et anti-allergique des flavonoïdes, activité anti-oxydante des polyphénols (Bruneton, 2009). Les terpénoïdes sont antibactériens, antifongiques, antiviraux et anti-protozoaires (Mayer et al, 2017). Les saponines sont connues par leur activité hémolytique et antimicrobienne (Bruneton, 2009). La nature de ces composés phytochimiques laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes des racines de *L. conifera*.

Comme les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta et al, 2005) ayant une grande activité pharmacologique, il est donc intéressant de les extraire et de déterminer leur quantité totale dans la partie utilisée de la plante. Plusieurs études montrent que le méthanol (ou l'éthanol) et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour extraire les composés phénoliques (Sahreen et al, 2010; Xia et al, 2010; Bouzid et al, 2011). Dans notre étude, nous avons préparé un extrait hydro-alcoolique (éthanol/eau : 80/20) qui a été par la suite fractionné par différents solvants organiques (dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol).

Suite à cette extraction, un dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux est réalisé selon la méthode de Folin Ciocalteu et la méthode du chlorure d'aluminium respectivement. Cette étude quantitative a révélé des taux variables en polyphénols et en flavonoïdes. Nos résultats montrent que les fractions acétate d'éthyle et dichlorométhane ont les teneurs les plus élevées en phénols et en flavonoïdes totaux. D'après [Djeridane et al. \(2006\)](#), cette abondance est caractéristique de la famille des Astéracées. Cela peut être expliqué par l'influence des conditions climatiques extrêmes (température élevée, exposition solaire, sécheresse et salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols ([Falleh et al, 2008](#)).

Les éléments minéraux sont des substances inorganiques, dont les plantes ont besoin pour assurer leur croissance et leur développement. Ces éléments, qui dépendent de plusieurs facteurs (le pH du sol, sa matière organique, sa teneur en argile et sa minéralogie, climat), sont présents dans les végétaux à des concentrations variables ([Ozyigit et al, 2018](#)). Dans notre étude, les concentrations des éléments minéraux étaient dans l'ordre $\text{Ca} > \text{Mg}^{+2} > \text{F}^- > \text{P} > \text{Zn} > \text{Al}^{+3} > \text{Cu} = \text{Fe}^{+3} > \text{Cr}^{+3}$. [Chizzola. \(2012\)](#), dans son étude sur les plantes médicinales originaires d'Europe et de la région méditerranéenne, a montré que les principaux macro-éléments minéraux s'accumulent généralement dans l'ordre $\text{K} > \text{Ca} > \text{Mg}$ et les teneurs en oligo-éléments diminuent généralement de $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cu}$.

On trouve ces éléments minéraux dans nos tissus et fluides comme ils sont nécessaires à la vie ([Malhotra, 1998; Eruvbetine, 2003](#)). Par exemple, le calcium qui est essentiel pour tous les organismes, il renforce les os, aide à la régulation du rythme cardiaque et il est nécessaire à la coagulation sanguine ([Ekaete et al, 2013](#)). Une carence en ion calcium dans le sang entraîne une maladie appelée «tétanie», ostéoporose, rachitisme,... etc. Un excès de concentration de calcium dans le sang peut conduire à la calcification de plusieurs organes internes ([Gupta et al, 2014](#)). Le phosphore est un constituant des os et des dents, des acides nucléiques, des phospholipides, des enzymes et des composés énergétiques. L'excès de phosphore dans le sang peut provoquer des démangeaisons et des douleurs articulaires et constitue un facteur de risque cardiovasculaire. Par ailleurs, l'hyperphosphorémie augmente la parathormone (PTH) et empêche la vitamine D d'agir.

Ces éléments minéraux sont, de ce fait, bénéfiques pour notre organisme mais leur présence peut aussi poser un problème notamment dans le traitement de la lithiase urinaire. Dans ce cas certains minéraux comme le calcium et le phosphore sont fortement cristallogènes et peuvent, dans certaines conditions, stimuler la cristallisation de différentes espèces cristallines. Dans la partie pratique suivante, on mettra concrètement en relief cet

aspect par la cristallisation de brushite sur un calcul oxalocalcique, en raison des teneurs importantes, des racines de *L conifera*, en calcium, et orthophosphate.

IV.1.5. Conclusion

Les différents tests de caractérisation phytochimique ont montré que les racines de *L conifera* renferment divers principes bioactifs (tanins condensés, polyphénols, flavonoïdes, saponosides, coumarines, stérols et terpènes). Une étude préliminaire de fractionnement de l'extrait hydro-alcoolique a été réalisée par différents solvant organique, dans le but de valoriser les composés polyphénoliques.

L'analyse quantitative des extraits/fractions des racines de *L conifera* a montré que la fraction acétate d'éthyle est riche en composés phénoliques.

La réalisation d'autres investigations complémentaires phytochimiques est nécessaire pour identifier, isoler et purifier les composés présents dans la plante et évaluer leurs effets biologiques.

IV.2. Etude de l'effet litholytique de l'extrait aqueux des racines de *L. conifera*

IV.2.1. Introduction

Il a été montré que la lithiase rénale est associée à une augmentation du risque d'insuffisance rénale, surtout si elle a été négligée. De plus, elle tend à récidiver d'autant plus si la maladie est prononcée chez un sujet jeune (avant 30-40 ans) (Traxer, 2011). Ce caractère récidivant et les complications engendrées rendent nécessaire la prévention et le traitement de cette maladie lithiasique.

Malheureusement, et malgré les progrès considérables des techniques urologiques, l'aspect préventif a été mal ou peu investi notamment dans les pays en voie de développement. La diversité des constituants lithiasiques identifiés dans les calculs urinaires (Plus de 90 constituants) laisse prédire une complexité aussi bien dans les mécanismes de la lithogénèse que dans les approches thérapeutiques à entreprendre pour arriver à terme de la récurrence lithiasique. A défaut d'une prise en charge post opératoire bien ciblée, les patients lithiasiques s'orientent généralement vers des traitements traditionnels comme la phytothérapie pour son efficacité présumée, son accessibilité, sa faible toxicité et sa disponibilité (Akharaiyi et Boboye, 2010).

En Algérie, les plantes médicinales restent largement utilisées notamment pour soulager des troubles rénaux tels que la lithiase urinaire et/ou sa récurrence. Plusieurs plantes ont fait l'objet d'une étude sur leur activité anti-lithiasique *in vitro* et/ou *in vivo* en Algérie (Beghalia et al, 2007 ; Amar et al, 2010 ; Hannache et al, 2012 ; Lakhdar-Toumi et al, 2015 ; Benalia et al, 2016). Cependant, l'utilisation de ces plantes médicinales se fait de manière empirique où les herboristes prescrivent, oralement, de véritables ordonnances, avec posologie, durée de traitement et voie d'administration, dans le traitement de la lithiase urinaire. Selon cette approche thérapeutique traditionnelle, le calcul urinaire est considéré comme une entité unique qui se traite d'une façon unilatérale préétablie et cela quelle que soit sa composition, les conditions et déséquilibres physico-chimiques responsables de sa formation (causes métabolique, congénitale, infectieuse et autres ...). L'effet des plantes reste tributaire de la composition du calcul urinaire et par conséquent, ces plantes peuvent avoir un effet bénéfique pour un type de lithiase mais pas autant pour d'autres types. Dans ce sens, certaines plantes peuvent éventuellement stabiliser et au-delà favoriser la croissance de certains calculs voir même la formation d'autres espèces cristallines.

Dans ce travail, et pour mettre en évidence cet aspect, on a réalisé une étude sur l'effet litholytique des racines de *L. conifera* sur deux types différents de calculs urinaires. Le

premier est celui de l'oxalate de calcium qui représente le type le plus fréquent et le deuxième est un calcul cystinique, d'origine congénitale fortement récidivant et pH dépendant.

IV.2.2. Matériel et méthodes

IV.2.2-1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux de *L. conifera* a été préparé par macération, pendant 12 heures, de 10 g de racines dans 100 ml de solution aqueuse de chlorure de sodium (*NaCl*) à 9 g/L à température ambiante. Cet extrait a été ensuite filtré pour être utilisé le jour même.

IV.2.2-2. Dissolution des calculs d'oxalate de calcium

Vingt-quatre calculs de whewellite de sous type Id (Daudon et al, 2012) ont été sélectionnés après analyse morpho-constitutionnelle. Leur taille moyenne était de 7.81 ± 0.06 mm et leur masse moyenne de 291.85 ± 0.31 mg.

Notre protocole est réalisé selon la méthode de Hannache et al. (2012), avec quelques modifications. Chaque calcul a été mis en suspension en présence de 40 ml de l'extrait aqueux (macérât aux concentrations : 2.5, 5, 10g / 100 ml) après être placé dans un sachet poreux afin d'éviter tout effet mécanique. La solution de *NaCl* de 9 g/l étant utilisée comme milieu témoin.

Les calculs ont été laissés au contact des extraits aqueux pendant huit semaines à température ambiante et sous agitation continue dans un shaker. Sachant que le macérât a été changés chaque 3 jours après mesure de son pH.

Tous les 15 jours, ils ont été sortis du milieu expérimental, lavés à l'eau distillée, séchés à 40°C durant 18 heures, puis pesés pour évaluer la perte de masse et ensuite replacés dans le milieu pendant les 15 jours suivants. Les pesées ont été réalisées au bout de deux, quatre, six et huit semaines.

A la fin de l'expérience, une observation sous microscope électronique à balayage (MEB : JEOL JSM-7100F) a été effectuée pour enregistrer toute modification structurale de la surface des calculs traités ou non par l'extrait de la plante.

Chacune des expériences a été répétée six fois dans les mêmes conditions et les résultats ont été exprimés en calculant la moyenne \pm SEM des valeurs obtenues.

IV.2.2.3. Dissolution des calculs de cystine

Vingt-quatre calculs rénaux de cystine pure de sous type Va (Daudon et al, 2012), de dimensions comparables ont été utilisés. Leur masse moyenne était de 152.02 ± 0.21 mg.

Partie pratique IV-2- Etude de l'effet litholytique de l'extrait aqueux des racines de *L. confiera*

Dans ce test, on a ajouté aux solutions préparées (macérât de plante aux concentrations 2.5, 5, 10g / 100 ml et solution témoin de NaCl 9g/L) un égal volume de tampon phosphate (Na₂ HPO₄ à M/15 et KH₂PO₄ à M/15) de pH égal à 6. Ce mélange a été testé sur des calculs de cystine selon le protocole décrit précédemment.

IV.2.2-4. Taux de dissolution

L'activité de chaque extrait a été évaluée en calculant le taux de dissolution des calculs après séjour de huit semaines dans le milieu expérimental (extrait) en comparant le poids résiduel des calculs par rapport à leur poids initial. Le pourcentage de dissolution a été calculé par la formule suivante (Saso et al, 1998) :

$$A = \frac{W_{initial} - W_{final}}{W_{initial}} \cdot 100$$

A : Taux de dissolution du calcul en %

$W_{initial}$ et W_{final} : Poids du calcul avant et après séjour dans l'extrait de la plante étudiée.

IV.2.2.5. Suivi du pH

A la différence des études antérieures sur l'effet litholytique des plantes médicinales (Hannache et al, 2012 ; Khouchlaa et al, 2017), dans la présente étude, le macérât des racines de *L. confiera* a été changé chaque trois jours afin d'éviter sa contamination. De ce fait, la mesure du pH a été effectuée pour l'ensemble des solutions par incrément de 3 jours et chaque valeur du pH présente une moyenne calculée sur la base de cinq mesures successives.

IV.2.3. Résultats

IV.2.3.1. Calculs d'oxalate de calcium monohydraté (Whewellite)

IV.2.3.1.1. Evolution du taux de dissolution

Le taux global de dissolution des calculs de whewellite par l'extrait aqueux des racines au terme de huit semaines d'incubation est illustré par la Figure 36. Pour l'ensemble des concentrations déployées ce taux de dissolution est compris entre $0.03 \pm 0.09\%$ (à 5g/100ml) et $0.25 \pm 0.12\%$ (pour 2.5g/100ml). La solution témoin de NaCl (9g/l) a entraîné une réduction de masse des calculs relativement plus importante avec un taux de $10.26 \pm 0.23\%$ en fin d'expérience. De ce fait, l'action litholytique de l'extrait de la plante étudiée sur les calculs de whewellite est quasiment absente. On retient cependant un effet inverse par un gain de masse au-delà de la 4^{ème} semaine de séjours dans cet extrait pour les différentes concentrations.

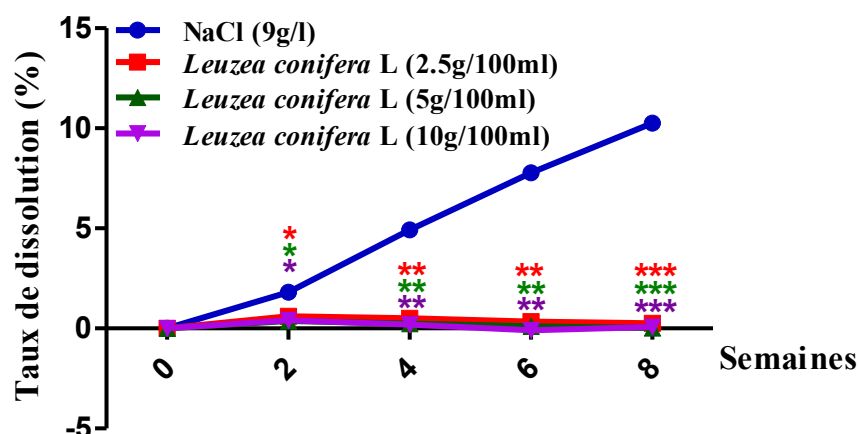


Figure 46: Taux de dissolution massique des calculs de whewellite dans l'extrait aqueux de *L. conifera* à différentes concentrations et dans la solution témoin de NaCl (9g/l).

* : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0.05$).
 ** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.01$).
 *** : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.001$).
 P : Seuil de signification.

IV.2.3.1.2. Evolution du pH

Dans le Tableau 33 sont rassemblés les valeurs du pH de l'ensemble des solutions ainsi que celle de la solution témoin mesurées régulièrement le long des 8 semaines de maintien.

Nous avons observé une augmentation du pH après 15 jours d'expérimentation (S2) pour les différentes concentrations de notre extrait passant d'un pH légèrement acide à un pH alcalin ($8.53 \pm 0.1 - 8.7 \pm 0.09$). Au-delà de la deuxième semaine le pH enregistre une légère baisse tout en restant dans le domaine alcalin. Pour la solution témoin de NaCl on observe également une augmentation du pH à S2 suivie cependant par une stabilisation de sa valeur dans le domaine alcalin.

Tableau 33 : Valeurs du pH mesurées le long de huit semaines d'expérimentation

Solutions	pH				
	Premier jour (j1)	Deux semaines (S2)	Quatre semaines (S4)	Six semaines (S6)	Huit semaines (S8)
NaCl (9g/l)	6.62 ± 0.14	$7.39 \pm 0.05^{**}$	$7.57 \pm 0.07^{**}$	$7.61 \pm 0.07^{**}$	$7.55 \pm 0.06^{**}$
<i>L.conifera</i> (2.5g/100ml)	6.44 ± 0.12	$8.53 \pm 0.1^{***}$	$7.9 \pm 0.1^{***}$	$7.55 \pm 0.13^{**}$	$7.69 \pm 0.06^{***}$
<i>L.conifera</i> (5g/100ml)	6.4 ± 0.12	$8.62 \pm 0.1^{***}$	$7.79 \pm 0.1^{***}$	$7.16 \pm 0.13^{**}$	$7.79 \pm 0.07^{***}$
<i>L.conifera</i> (10g/100ml)	6.4 ± 0.1	$8.7 \pm 0.09^{***}$	$7.95 \pm 0.15^{***}$	$7.46 \pm 0.1^{***}$	$7.4 \pm 0.11^{***}$

(*) : Comparaison deux à deux vs j1
 * : Différence significative ($P \leq 0.05$).
 ** : Différence hautement significative ($P \leq 0.01$).
 *** : Différence très hautement significative ($P \leq 0.001$).
 P : Seuil de signification.

IV.2.3.1.3. Observation micrographique et analyse spectrophotométrique

L'état de surface des calculs de whewellite maintenus 8 semaines en solution (extrait aqueux et témoin) a été observée par microscopie électronique à balayage (Fig.37). Pour l'échantillon maintenu dans la solution témoin de NaCl (Fig. 37c et d) la surface présente une faible érosion avec plus de relief comme elle paraît superficiellement plus abrasée que celle de l'échantillon de Whewellite non traité (Fig. 37a et b). Pour ce qui est du troisième échantillon de whewellite, le séjour de 8 semaines dans l'extrait de *L. conifera* a modifié considérablement son état de surface laissant apparaître, au terme de séjours, de grosses aiguilles ou baguettes enchevêtrées les uns aux autres avec la présence locale de petits espaces (Fig. 37e et f). Cet état de surface est témoin d'une action certaine de l'extrait de plante sur le calcul de whewellite qui se produit apparemment sans perte de masse voir même par gain massique.

L'analyse de la surface de ces échantillons par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (Fig. 38) nous a révélé, dans le cas de l'échantillon de whewellite ayant séjourné 8 semaines dans l'extrait de plante (10 g/100ml), que la surface est composée essentiellement de « Brushite » (Fig. 38c) alors qu'initialement, et lors du séjour dans la solution témoin, la structure de la surface est exclusivement formée de whewellite (Fig. 38a et b).

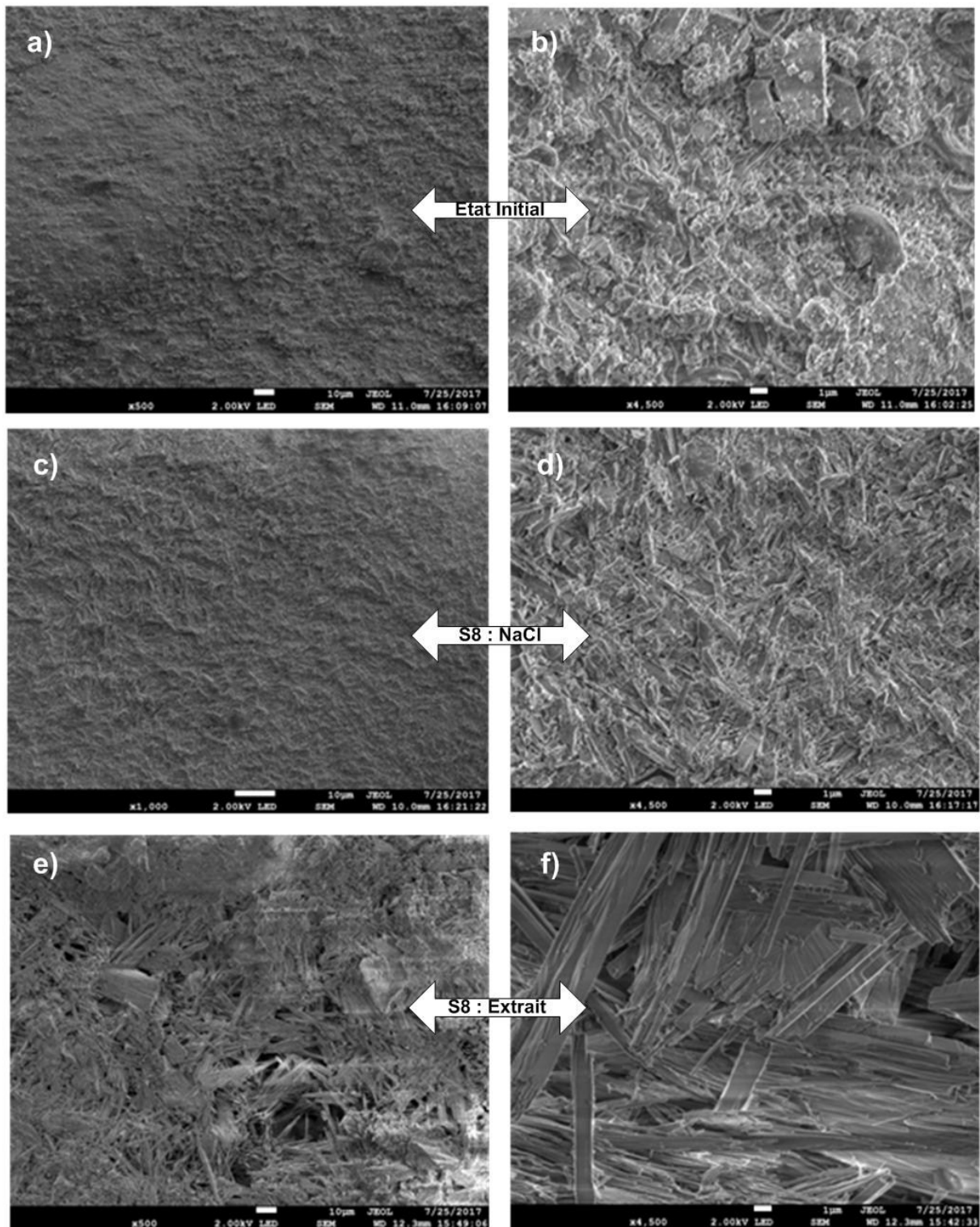


Figure 37: Surface des calculs de whewellite observée sous MEB : **Etat initial** sans traitement (a et b), après séjours de 8 semaines dans la solution témoin de NaCl (c et d) et après séjours de 8 semaines (S8) dans l'extrait aqueux des racines de *Leuzea confifera* (c et d)

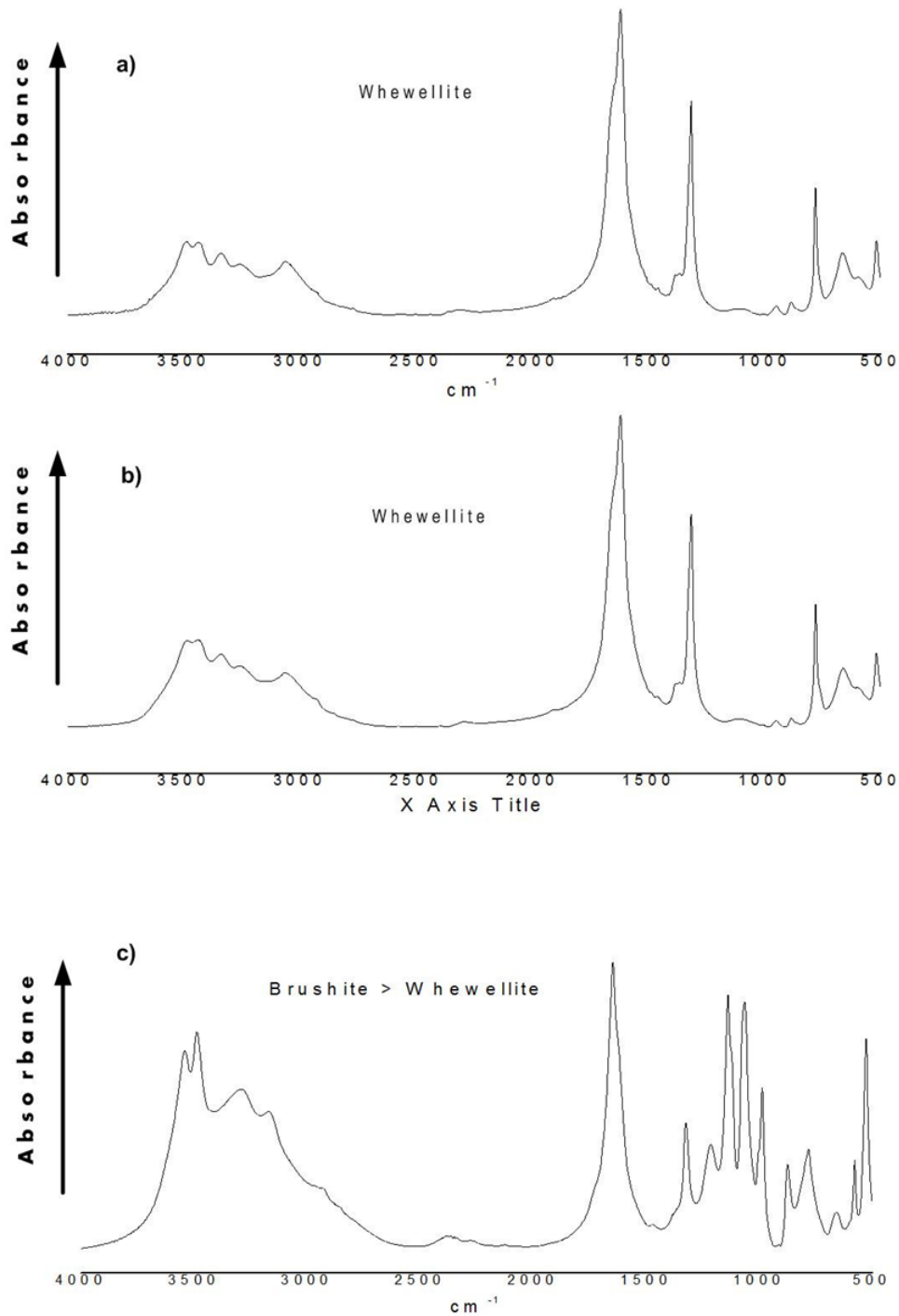


Figure 38: Analyse IRTF de la Surface des calculs de whewellite

- Surface de l'état initial composée de Whewellite (C1)
- Surface de l'échantillon ayant séjourné 8 semaines dans la solution NaCl composée de C1
- Surface de l'échantillon après séjours de 8 semaines dans l'extrait de plante composée essentiellement de Brushite

IV.2.3.2. Calculs cystiniques

IV.2.3.2.1. Evaluation du taux de dissolution

La Figure 39, montre l'évolution du taux de dissolution des calculs au cours des 8 semaines d'expérimentation pour les différentes concentrations de notre extrait aqueux et pour la solution témoin de NaCl. Le taux de dissolution de ces calculs augmente progressivement aussi bien avec la durée du séjour et la concentration de l'extrait. Au terme de ce séjour, les taux de perte massique des calculs de cystine dans l'extrait aqueux de la plante aux concentrations 2.5, 5 et 10g/100ml sont respectivement de 32.11±0.21%, 66.7±0.58%, 72.57±0.29% significativement plus importants que celui obtenu dans la solution témoin (22.99±0.42%)

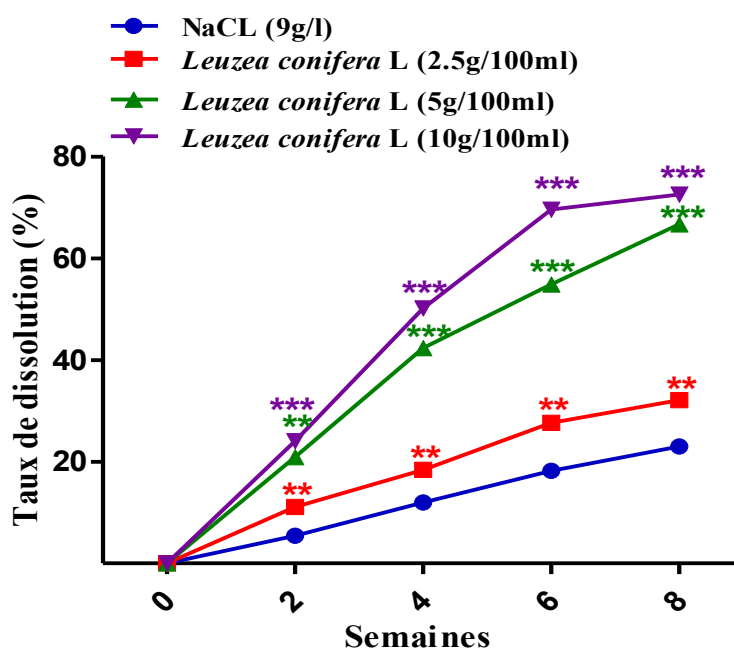


Figure 39 : Taux de dissolution massique des calculs de cystine dans l'extrait aqueux de *L. conifera* à différentes concentrations et dans la solution témoin de NaCl (9g/l).

* : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0.05$).

** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.01$).

*** : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.001$).

P : Seuil de signification.

IV.2.3.2.2. Evolution du pH

Les résultats (Tableau 34) montrent que, pendant les huit semaines de l'expérience, les valeurs de pH enregistrées sont plus ou moins stables et autour de celle du tampon utilisé (pH 6), cela pour l'extrait de plante et la solution témoin (NaCl).

Tableau 34 : Valeurs du pH mesurées le long de huit semaines d'expérimentation

Solutions	pH				
	Premier jour (j1)	Deux semaines (S2)	Quatre semaines (S4)	Six semaines (S6)	Huit semaines (S8)
NaCl (9g/l)	5.98±0.04	5.87±0.03 ^{***}	5.93±0.03 [*]	5.84±0.04 ^{***}	5.81±0.02 ^{***}
<i>L.conifera</i> (2.5g/100ml)	5.93±0.04	5.88±0.04	5.99±0.06	6.03±0.07	6.00±0.06
<i>L.conifera</i> (5g/100ml)	5.96±0.06	6.01±0.06	6.02±0.06	6.07±0.05	6.01±0.04
<i>L.onifera</i> (10g/100ml)	6.04±0.08	6.06±0.06	6.11±0.03	6.09±0.03	6.13±0.02

(*) : Comparaison deux à deux vs j1

* : Différence significative ($P \leq 0.05$).

** : Différence hautement significative ($P \leq 0.01$).

*** : Différence très hautement significative ($P \leq 0.001$).

P : Seuil de signification.

IV.2.3.2.3. Observation micrographique

Initialement l'état de surface des calculs de cystine se distingue par une structure compacte composée de cristallites bien agencés dont on peut deviner pour certains la forme hexagonale caractéristique de ce composant lithiasique (Fig. 40a). Certaines plages en surface font ressortir également cette forme hexagonale par l'interposition des macles de croissance au niveau des faciès des cristallites (Fig. 40b). Après séjours de huit semaines dans la solution témoin de NaCl on constate une érosion en surface avec une perte partielle de relief et, de ce fait, un gommage de la forme hexagonale des cristallites (Fig.40c et d). L'effet de l'extrait aqueux de la plante utilisée sur l'état de surface des calculs de cystine est plus accru. En effet, dans le cas de l'extrait de *L. conifera* (5g/100ml), après huit semaine de séjours, on observe une surface fortement dégradée (Fig. 40e) laissant apparaître par endroits des cristallites des couches plus profondes témoin d'une action de dissolution plus active (Fig. 40f).

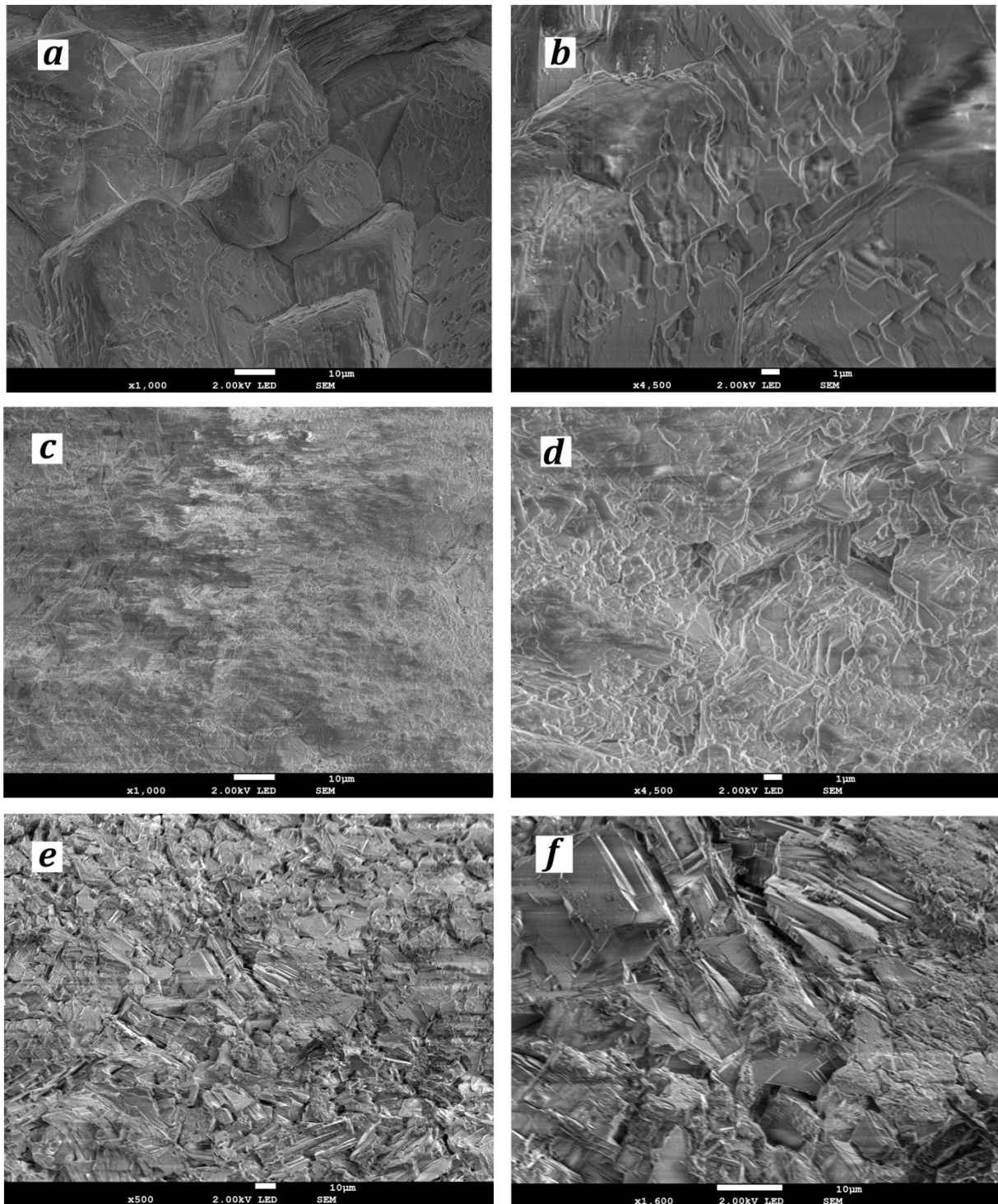


Figure 40 : Micrographies visualisées par MEB de l'état de surface des calculs cystiniques : (a, b) avant traitement, (c, d) après séjours de huit semaines dans une solution aqueuse de *NaCl*, (e, f) après séjours de huit semaines dans l'extrait de *Leuzea conifera*.

IV.2.4. Discussion

En Algérie, le recours à la médecine douce est largement sollicité dans le traitement de la lithiase urinaire et la consommation des plantes médicinales en automédication ne cesse de progresser, plusieurs enquêtes ethnobotaniques ont mis en évidence cette tendance (Hammiche et al, 2006 ; Sekkoum, 2011 ; Khitri et al, 2016). De plus, plusieurs études ont été réalisées, *in vitro*, pour tester l'effet litholytique des plantes médicinales (Hannache et al, 2012 ; Benalia et al, 2016). *L. conifera* n'a pas fait l'objet des tests *in vitro* sur les calculs rénaux. Cette plante médicinale est sélectionnée pour notre étude dans le but de vérifier son efficacité litholytique sur deux types de lithiases à savoir la lithiase oxalocalcique et la lithiase cystinique. La lithiase oxalocalcique a été choisie pour sa prédominance aussi bien en Algérie que dans d'autres pays (El Kabbaj et al, 2000 ; Daudon et al, 2008 ; Alaya et al, 2012 ; Bouslama et al, 2015) et la lithiase cystinique, pour son origine congénitale. Cette dernière résulte, en effet, d'une affection héréditaire à transmission autosomique récessive, représentant une des lithiases les plus rare et à fort potentiel de récurrence (Jungers et al, 2001 ; Traxer et al, 2008).

D'après les résultats obtenus sur les calculs de whewellite, on a constaté que l'extrait aqueux des racines de *L. conifera* à différentes concentrations n'a pas exercé l'effet litholytique souhaité bien au contraire un gain massique a été constaté durant les dernières semaines du séjour expérimental. L'observation par microscopie électronique à balayage ainsi que l'analyse par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier ont révélé que ce gain massique est en rapport avec la formation d'un dépôt de brushite lors du maintien dans l'extrait aqueux.

La brushite ou phosphate acide de calcium dihydraté ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), est l'une des espèces cristalline de phosphate la plus acide et de caractère récidivant. A l'échelle mésoscopique et microscopique les cristallites de brushite se présentent en aiguilles et baguettes de grande dimension (souvent supérieur à $50\mu\text{m}$) ce qui leur confère d'une part un caractère agressif pour le parenchyme rénal et d'une autre une facilité d'agrégation entraînant un risque lithogène accru (Daudon et al, 2000 ; Rouzière et al, 2009).

Cette espèce cristalline est calcium dépendante, comme elle est composée d'ions HPO_4^{2-} . Egalement pH dépendante, la brushite se cristallise spontanément, dans un milieu plus acides (pH voisin de 6.4) que les autres phosphates, même si elle peut les accompagner à des pH parfois élevés (Daudon et al, 2000 ; Daudon, M et al, 2010). Ainsi, l'apport en PO_4^{3-} est assuré, par les racines de la plante. Quant à l'ion H^+ , il provient de la solution initiale ($\text{pH}_{\text{initial de l'extrait}} = 6.4$) renouvelée chaque trois jours assurant en permanence et tout au long de

Partie pratique IV-2- Etude de l'effet litholytique de l'extrait aqueux des racines de *L. confifera*

l'expérience leur présence. L'augmentation de la valeur du pH, enregistrée lors du séjour en solution d'extrait aqueux, indique justement une consommation des ions H^+ du milieu expérimental. A ces éléments, s'ajoute le calcium provenant aussi bien du calcul oxalocalcique que de la plante, permettant ainsi d'avoir des conditions favorables à la cristallisation de brushite (Bensekrane et al, 2015).

Contrairement à l'oxalate de calcium, la cystine est une espèce cristalline pH dépendante et peut être dissoute en milieu alcalin, particulièrement au-dessus de 7.6 (Traxer et al, 2008), d'où l'importance d'utiliser un tampon phosphate pour maintenir un pH légèrement acide des solutions testés (macérât et NaCl) et de s'assurer ainsi que s'il y a dissolution elle sera tributaire des principes actifs de la plante et non pas de l'alcalinisation du milieu.

A ces valeurs de pH plus au moins acides, on a enregistré une augmentation significative des taux de dissolution des calculs en présence des extraits aqueux des racines de *L. confifera* par rapport à la solution témoin. Sachant que la cystine est peu soluble pour ces valeurs de pH (Daudon et al, 2012), sa dissolution ne peut être due qu'aux principes actifs présents dans la plante. À ce jour, les molécules responsables ainsi que les mécanismes d'action ne sont pas connus. Meiouet et al. (2011), suggèrent que l'effet litholytique des plantes peut être dû à des interactions établies entre les principes actifs de la plante et la cystine. En effet, les groupements fonctionnels des flavonoïdes ou des saponosides vont former des liaisons hydrogènes et des liaisons hydrophiles avec les fonctions carboxyliques ou amines de la molécule de cystine (Meiouet et al, 2011). Le complexe ainsi formé est plus soluble que la cystine d'où la dissolution de cette dernière, même en milieu légèrement acide.

Les observations micrographiques à l'échelle mésoscopique montrent une érosion en surface des calculs de cystine ayant séjournés dans l'extrait de *L. confifera* témoignant ainsi de sa dissolution. Dans leur étude, Hannache et al. (2012), l'effet des plantes d'*Arenaria ammophila* et de *Parietaria officinalis* s'est soldé également par une érosion conséquente en surface observée à l'échelle mésoscopique mettant en évidence une perte partielle ou totale de la forme hexagonale des cristallites de cystine et la présence de feuillets séparés par des espaces plus ou moins larges. Ces mêmes caractéristiques d'érosion en surface (structure en feuillets et perte de la forme typique hexagonale) ont été également observées par Bazin et al sur des calculs de cystine collectés auprès de patients recevant des médicaments sulfhydrylés porteurs de groupements thiol (Tiseliuss, 2010).

IV.2.5. Conclusion

L'effet litholytique des racines de *L. conifera* sur deux composants lithiasiques, dont la whewellite de sous type Id et la cystine de sous type Va, n'a été probant que pour ce dernier composant. Dans le cas des calculs de whewellite, le séjour de huit semaines dans l'extrait aqueux de *L. conifera* s'est manifesté plutôt par un gain massique lié à la formation en surface de brushite. Le recouvrement des calculs de whewellite par cette nouvelle espèce cristalline (brushite) rend vaine toute action litholytique de cet extrait de plante sur ce composant lithiasique. En outre, les cristallites en aiguille avec lesquelles se cristallise la brushite, observés à l'échelle mésoscopique, laissent prédire une action très agressive de cette dernière sur le parenchyme rénal. Cette étude dégage, de ce fait, un aspect important de l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement de la lithiase urinaire. En effet, l'effet litholytique éventuel d'une plante sur un composant lithiasique ne peut en aucun cas être généralisé pour l'ensemble des composants lithiasiques. La composition du calcul urinaire, la phytochimie de la plante utilisée sont des facteurs déterminants pour toute action litholytique probante sans risque aggravant.

IV.3. Test d'inhibition cristalline *in vitro* de l'oxalate de calcium par les extraits des racines de *Leuzea conifera*

IV.3.1. Introduction

Les urines représentent un milieu sursaturé en permanence vis-à-vis d'une ou de plusieurs espèces cristallines (Winkens *et al.*, 1988). Cette sursaturation urinaire est la première étape du processus lithogène qui génère la phase insoluble primitive constituée de cristaux et en assure leur croissance (Daudon, 1989). En effet, lorsque la sursaturation est suffisante, elle conduit à la nucléation de cristaux puis à leur croissance qui, suite à une agrégation, peuvent entraîner la formation de calculs (Hennequin *et al.*, 1993).

Dans le cas des calculs d'oxalate de calcium, le risque cristallogène est lié à une rupture d'équilibre entre les substances promotrices (comme l'oxalate et le calcium) et les substances inhibitrices qui peuvent ralentir ou empêcher la formation de l'oxalate de calcium. Afin de réduire ce facteur de cristallisation et d'éviter la formation des calculs par précipitation de l'oxalate de calcium, nous avons testé l'activité inhibitrice de différents extraits de *L. conifera* sur les différentes phases de cristallisation oxalocalcique (nucléation, croissance et agrégation cristalline) en utilisant une méthode similaire à celle proposée par Jungers *et al.* (1989) avec quelques modifications. Dans cette expérience, la cristallisation oxalocalcique a été induite par addition au milieu réactionnel de solutions contenant des ions calcium et oxalate sachant que les concentrations de ces derniers dépassent celles de l'urine dans des conditions physiologiques.

L'évolution de la cristallisation en présence et en absence des extraits/fractions de la plante, se fait par l'observation microscopique (microscope à polarisation) à 0, 5, 10, 15, et 20min et par la mesure de la densité optique à 620nm chaque 5min pendant 20min.

IV.3.2. Matériel et méthodes

IV.3.2.1. Essais sans inhibiteur

Le mélange réactionnel, préparé dans un tube à essai, est composé d'un volume de 7.5ml de solution de chlorure de potassium (KCl à 0.2M), 1.5 ml du tampon phosphate (pH 6) et 150µl de solution de chlorure de calcium (CaCl₂.2H₂O à 0.1M) auxquels on ajoute après agitation 500µl de l'eau distillée. En guise de référence, on enregistre, à ce stade, la valeur de l'absorbance à 620nm. On rajoute ensuite 150µl de la solution d'oxalate de sodium (Na₂C₂O₄ à 0.1M) préalablement maintenue à 37°C pour initier la formation des cristallites d'oxalate de calcium et on mesure à cet instant même ($t_0 = 0s$) l'absorbance à 620 nm de ce mélange puis chaque 5 minutes pendant 20 min.

IV.3.2.2. Essais d'inhibition cristalline avec les extraits/fractions de plante

En réalisant le même mélange réactionnel, précédemment explicité, on rajoute 500 μ l de chaque extrait/fraction de la plante *L. conifera* pour deux concentrations différentes (0.5 et 1mg/ml). Dans ce test l'acide citrique (3mM) est utilisé comme standard à une concentration physiologique. Ainsi, l'étude de la cinétique de cristallisation (par mesure de la DO) des cristaux d'oxalate de calcium en présence de ces extraits permettra d'estimer leur effet inhibiteur.

IV.3.2.3. Pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition ($I\%$) est calculé selon la formule suivante (Kumar et al, 2013) :

$$I\% = \left(\frac{ASI - AAI}{ASI} \right) 100$$

ASI : Absorbance sans inhibiteur

AAI : Absorbance avec inhibiteur

IV.3.2.4 Observation microscopique

Le contrôle de la cristallisation de l'oxalate de calcium a été assuré par le suivi de la formation des cristaux en prélevant, avec une pipette de Pasteur, un échantillon de la suspension homogène qu'on place en cellule de Malassez pour enfin être examiné au microscope optique à polarisation-Olympus CX41 (grossissement x100 et x400).

IV.3.3. Résultats

IV.3.3.1. Cinétique de cristallisation de l'oxalate de calcium in vitro en présence et en absence des extraits/fractions des racines de *Leuzea conifera*

Dans la Figure 41 sont représentées les évolutions en fonction du temps de l'absorbance du mélange réactionnel en absence et en présence de l'acide citrique (3mM) et des différents extraits/fractions de la plante aux concentrations de 0.5 et 1g/l chacun.

On remarque, pour tous les extraits, que les valeurs de l'absorbance augmentent quand la concentration augmente, mais qui restent au-dessous de celles du témoin (sans inhibiteur) sauf pour le macérât à une concentration de 1g/l d'où les valeurs négatives du pourcentage d'inhibition relatives à cet extrait (Tableau 35).

L'effet inhibiteur maximal a été enregistré pour le décocté à 0.5 g/l où l'on enregistre des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 99.07%, 97.73%, 96.14%, 94.55% et 94.08% aux

temps 0, 5, 10, 15 et 20min respectivement. Le citrate (3mM) a également montré une activité inhibitrice importante de la cristallisation oxalocalcique après celle du décocté à 0.5 g/l (0min : 34.57%, 5min : 67.84%, 10min : 65.3%, 15min : 65.63%, 20min : 65.07%). Des pourcentages d'inhibitions importants, mais relativement moins intenses, ont été remarqués aussi pour les fractions butanolique et acétate d'éthyle à 0.5 g/l.

Tableau 35: Pourcentage d'inhibition de la cristallisation oxalocalcique, en présence des différents extraits/fractions de *L conifera* et de citrate

Extraits	Temps (min)				
	0	5	10	15	20
Macérât (0.5mg/ml)	26.93	22.16	16.76	15.69	12.08
Macérât (1mg/ml)	4.6	-11.41	-12.15	-4.86	-4.25
Décocté (0.5mg/ml)	99.07	97.73	96.14	94.56	94.08
Décocté (1mg/ml)	12.07	21.03	21.32	23.77	30.38
Extrait brut (0.5mg/ml)	16.71	31.24	35.86	40.98	46.71
Extrait brut (1mg/ml)	-5.88	17.78	17.82	13.58	9.03
Dichlorométhane (0.5mg/ml)	47.68	28.81	32.71	31.5	25.54
Dichlorométhane (1mg/ml)	12.38	13.57	17.64	11.12	8.67
Acétate d'éthyle (0.5mg/ml)	73.37	31.08	28.50	31.85	27.51
Acétate d'éthyle (1mg/ml)	17.34	18.12	20.62	22.54	27.87
Butanol (0.5mg/ml)	79.26	40.97	42.17	42.74	41.67
Butanol (1mg/ml)	76.78	29.46	30.61	30.62	31.10
Citrate (3mM)	34.57	67.84	65.30	65.63	65.07

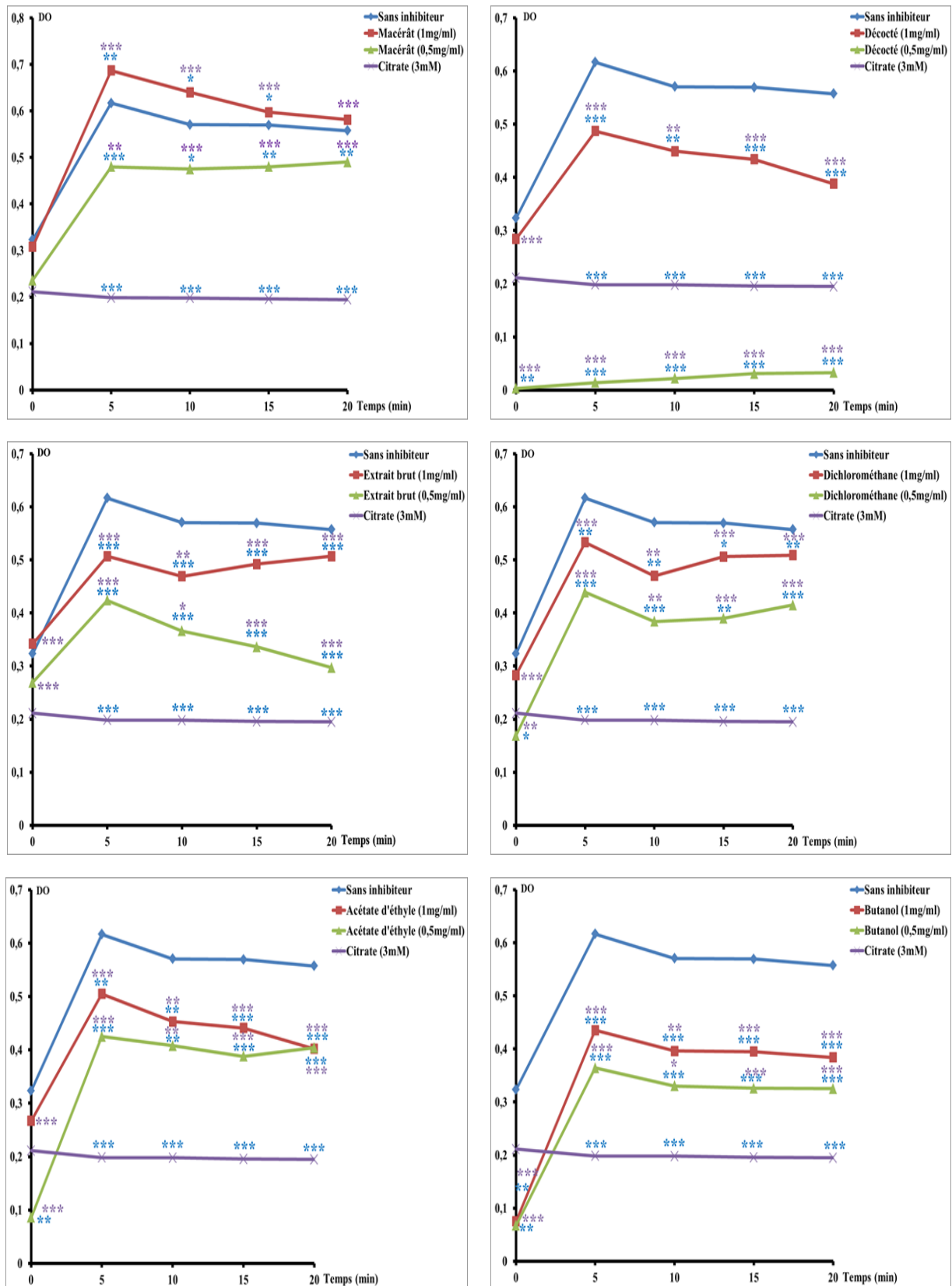


Figure 41 : Variation de l'absorbance des extraits de la plante à différentes concentrations en fonction du temps.

* : Différence significative comparant au témoin
 ** : Différence hautement significative comparant au témoin
 *** : Différence très hautement significative comparant au témoin

* : Différence significative comparant au citrate.
 ** : Différence hautement significative comparant au citrate
 *** : Différence très hautement significative comparant au citrate

IV.3.3.2. Observations microscopiques

Comme il est difficile de mettre en évidence les différentes phases de cristallisation (nucléation, croissance cristalline et agrégation) aux temps d'induction, une observation microscopique (microscope optique à lumière polarisée) a été réalisée pendant l'étude de la cristallisation en absence et en présence d'inhibiteur en fonction de la cinétique de cristallisation.

En absence d'inhibiteur, les micrographies (Fig. 42) révèlent la formation de cristaux de forme ovale caractéristique de l'oxalate de calcium monohydraté (whewellite ou C1). Le nombre de ces cristaux est assez important dès la 5^{ème} minute. Ces derniers se rassemblent par la suite en agrégats qui prennent de plus en plus de taille en fonction du temps.

En présence de l'extrait aqueux de la plante (décocté), les micrographies révèlent la formation des cristaux ovales d'oxalate de calcium en nombre relativement réduit. Les agrégats formés au cours du temps sont aussi en nombre et en dimension relativement assez réduits. Les mêmes observations ont été enregistrées pour le cas de l'acide citrique (3mM).

Pour le macérât à 1g/l, en plus de quelques cristaux de C1, on a observé aussi des cristaux octaédriques, caractéristiques de l'oxalate de calcium dihydraté (C2), en nombre important mais de petite taille (Fig. 43).

Témoin
(en absence d'inhibiteur)

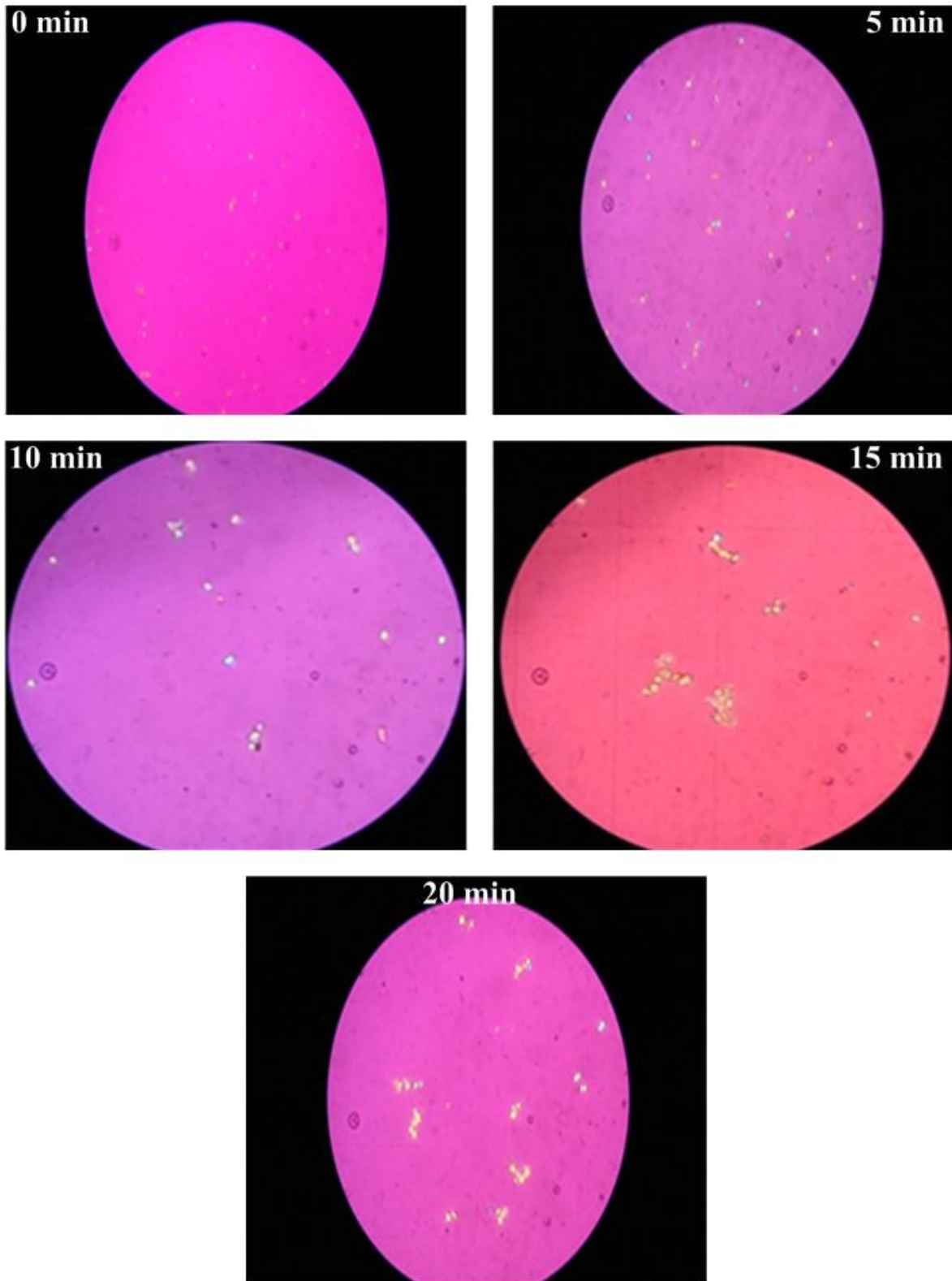


Figure 42 : Micrographies de la cristallisation en absence de l'inhibiteur

Macérât (1mg/ml)

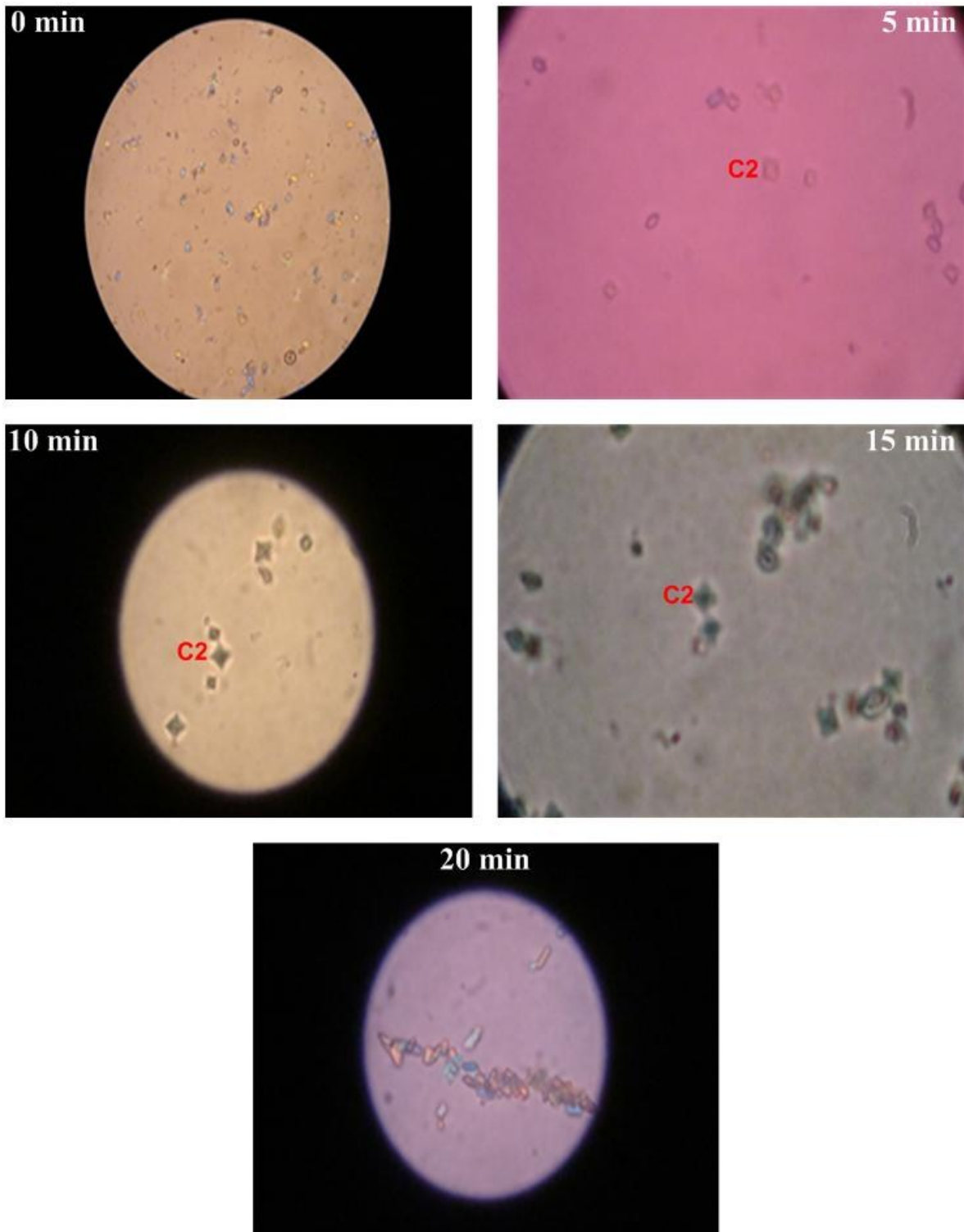


Figure 43 : Micrographies de la cristallisation en présence de l'inhibiteur (macérât à 1mg/ml)

IV.3.4. Discussion

Dans l'étude précédente, nous avons testé l'effet litholytique de *L. conifera* sur le calcul urinaire. Nous avons observé que cette plante a un effet sur la dissolution des calculs de cystine, par contre, elle n'a exercé aucun effet sur la dissolution des calculs d'oxalate de calcium. Par conséquent, afin d'éviter la précipitation d'oxalate de calcium et la formation de calculs, nous avons évalué l'activité anti-lithiasique des extraits/fractions des racines de *L. conifera* dans la cristallogénèse sur des urines synthétiques.

L'action d'une plante sur la cristallisation d'une espèce lithogène peut avoir lieu sur une ou plusieurs étapes de la lithogénèse qui sont : la sursaturation urinaire, la nucléation cristalline, la croissance des cristaux, leur agrégation et enfin sur la croissance du calcul (Daudon *et al*, 2008).

Les travaux sur la cristallisation *in vitro*, de l'oxalate de calcium, sont nombreux. Les modèles proposés utilisent des urines naturelles ou des solutions sursaturées se rapprochant des urines des sujets lithiasiques. Le modèle de cristallisation d'oxalate de calcium *in vitro* proposé dans ce travail a été développé par Junjers *et al*. (1989). C'est un modèle simple qui permet de suivre la cinétique de cristallisation dans un milieu aqueux (urines synthétiques). La formation des cristaux de CaOx en utilisant les solutions NaOx et CaCl, a été directement suivie par l'observation microscopique et mesure de l'absorbance. La variation de la densité optique des solutions turbides dépend du nombre et de la taille de particules présentes.

En plus des différents extraits de la plante, on a utilisé le citrate à une concentration physiologique (3mM) (Abdelmalek *et al*, 2001). C'est un excellent inhibiteur de la cristallisation et qui est utilisé dans le traitement et la prévention de la lithiase urinaire (Abdelmalek *et al*, 2001). En présence de calcium, il se complexe et diminue la sursaturation d'oxalate de calcium (Marangella *et al*, 2004 ; Farmanesh *et al*, 2013) et inhibe la formation du nucleus, sa croissance et son agrégation, dans les urines naturelles (Felix *et al*, 2015)

Les travaux réalisés par Shang *et al*. (2013), ont montré que le citrate de potassium administré par voie orale aux patients ayant des calculs d'oxalate de calcium, a conduit à l'apparition de dépressions à la surface des cristaux urinaires de C1, qui par conséquent semblaient concaves avec des bords arrondis et émoussés, tandis que leur taille diminuait. Ces cristaux de C1 arrondis sont thermodynamiquement moins stables et présentent une affinité diminuée pour les membranes des cellules rénales et donc leur adhérence à ces cellules devient inférieure à celle obtenue pour la forme habituelle de C1 (Mittal *et al*, 2015). Ces

cristaux de C1 de forme modifiée peuvent être plus facilement excrétés par les voies urinaires, empêchant ainsi la génération de calculs rénaux.

Dans notre étude, les mesures de l'absorbance nous ont permis de constater en premier lieu l'effet inhibiteur remarquable du citrate à 3mM sur la cristallisation de l'oxalate de calcium monohydraté comme révélé par [Hennequin et al. \(1993\)](#). Au-delà, on a pu constater aussi que les meilleures performances inhibitrices sont enregistrées pour le décocté à 0.5mg/ml en comparaison aussi bien avec le citrate que les autres extraits de *L. conifera*. En effet le pourcentage d'inhibition dans le cas de décocté à 0.5 a atteint une valeur de 94% après 20min d'incubation contre 65% pour le citrate et des valeurs moindres pour les autres extraits.

En accord avec les mesures de l'absorbance, l'observation micrographique a montré que la supplémentation en décocté à 0.5mg/ml, réduit considérablement le nombre et la taille des cristaux et d'agrégats de cristaux de C1 formés. Cela suggère des effets inhibiteurs aussi bien sur la germination de ces cristaux (par leur nombre réduit) mais aussi sur leur croissance (par leur taille réduite). Ces mêmes effets ont été observés dans le cas du citrate mais à un degré moindre qui se manifeste par une taille moyenne des cristaux de C1 relativement plus grossière que celle observée avec le décocté à 0.5mg/ml.

Pour les extraits organiques utilisés, la fraction butanolique et acétate d'éthyle ont donné un effet inhibiteur remarquable sur la cristallisation de la whewellite. Cet effet inhibiteur de nos extraits s'impose beaucoup plus à faible dose. En effet, on a enregistré une augmentation de l'absorbance avec augmentation de la concentration des extraits de la plante et surtout pour le macérât qui, à une concentration de 1mg/ml présente des valeurs d'absorbance plus importantes que celles du témoin (milieu sans inhibiteur). Les observations micrographiques correspondantes ont mis en évidence une formation importante de cristaux de weddellite (C2) à faciès octaédriques et en nombre réduit de cristaux ovales de whewellite (C1) expliquant ainsi les valeurs de DO élevées. Par ailleurs, et à la différence des autres extraits ainsi que le citrate (3mM), le macérât de la plante à 1mg/ml a favorisé la formation des cristaux de C2, en grand nombre et à faible dimension, au dépend des cristaux ovales de C1 dans une solution initialement sursaturée en oxalate donc favorisant normalement la formation de C1. De ce fait, on peut dire que le macérât de la plante à 1mg/ml inhibe la formation des cristaux de C1 tout en favorisant la germination des cristaux octaédriques de C2 dans un contexte d'hyperoxalurie. A ce niveau, il y a lieu de signaler que les cristaux de C2 se développent normalement dans un contexte d'hypercalciurie ([Daudon et al, 2012](#)). En outre, la croissance des cristaux de C2 reste assez limitée vu que ces cristaux sont, malgré leur grand nombre, à dimension réduite et ne se rassemblent pas en agrégats cristallins.

Dans des études antérieures sur des urines naturelles des personnes saines, [Amar et al. \(2010\)](#), [Djaroud et al. \(2013\)](#), ont constaté que l'extrait aqueux de *Hordeum vulgare* et celui de *Parietaria officinalis*, ont un effet inducteur de la cristallisation de l'oxalate de calcium dihydraté (weddellite) puisque leur présence à concentration élevée a eu pour effet l'augmentation du nombre de cristaux. De même, l'étude d'[Atmani et al. \(2000\)](#), utilisant l'extrait aqueux d'*Herniaria hirsuta*, montre l'augmentation du nombre des cristaux de weddellite dans les urines naturelles tout en diminuant leur taille. Ce changement de forme cristalline de C1 à C2, peut être dû à la présence, dans l'extrait aqueux, de substances inhibitrices de la croissance de l'oxalate de calcium monohydraté et inductrices de la cristallisation de C2.

[De Bellis et al. \(2019\)](#) ont montré que l'utilisation de l'extrait aqueux de *Ceterach officinarum* à une concentration de 120 à 500 µg/ml a favorisé la formation de C1 et de C2, tandis qu'à une concentration entre 500 et 1000 µg/ml, exclusivement des cristaux de C2 ont été observés. Cela peut être dû à l'adhésions des composants de la plante à la surface des cristaux de C1, modifiant ainsi les propriétés chimiques de ces cristaux et influençant la direction de la croissance cristalline ([De Bellis et al, 2019](#)).

Les cristaux de C2, qui se retrouvent fréquemment dans l'urine des sujets sains, sont moins susceptibles d'adhérer et d'être retenus par les surfaces des cellules rénales que les cristaux de C1, et donc causer moins de dommages aux cellules tubulaires.

Les racines de *L conifera* peuvent contenir des molécules inhibant la cristallisation d'oxalate de calcium de C1 qui représente la forme cristalline la plus dangereuse dans la lithogénèse en raison de son affinité pour les cellules tubulaires ([Schroder, 1995 ; Aggarwal et al, 2010](#)).

IV.3.5. Conclusion

Cette étude suggère que les extraits/fractions des racines de *L conifera* ont un potentiel effet inhibiteur de la cristallisation d'oxalate de calcium monohydraté. Cette plante pourrait être bénéfique dans le traitement préventif de la lithiase oxalocalcique. Les travaux se poursuivent pour identifier les molécules actives et bien caractériser leurs mécanismes d'action sur la cristallogénèse.

IV.4. Etude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits aqueux et organiques des racines de *Leuzea conifera*

IV.4.1. Introduction

L'exposition des cellules rénales à l'oxalate (Ox) et / ou aux cristaux d'oxalate de calcium (CaOx) conduit à la production d'espèces réactives d'oxygène (EROs), au développement du stress oxydatif suivi d'une lésion et d'une inflammation rénale (Khan, 2005). Ces derniers jouent un rôle majeur dans la formation des calculs urinaires (Aggarwal et al, 2013) ayant une composition oxalocalcique qui se manifeste souvent en oxalate de calcium monohydraté.

En plus des effets toxiques de l'oxalate, la dureté élevée de ces calculs urinaires oxalocalciques présente une forte résistance lors de leur élimination par les différentes techniques non invasives ou semi invasives connues telles que la Lithotripsie Extracorporelle (LEC) et la Néphro-Lithotomie Percutanée (NLPC). Cela entraîne généralement des effets secondaires indésirables dont les hémorragies, l'hypertension, la nécrose tubulaire et la fibrose du rein responsables des lésions cellulaires qui sont précurseurs de la récurrence lithiasique (Hovda et al, 2010).

Des études antérieures basées sur la culture des cellules rénales, ou *in vivo*, montrent que les traitements anti-oxydants réduisent les dépôts de cristaux CaOx ainsi que les lésions induites par l'hyperoxalurie (Itoh et al, 2005 ; Lee et al, 2012). Un potentiel thérapeutique important se dégage alors par l'utilisation de ces antioxydants et piègeurs de radicaux libres pour réduire le risque de la récurrence lithiasique, en particulier après des séances de LEC (Cathignol et al, 2000).

C'est la raison pour laquelle on est intéressé par l'étude de l'évaluation des activités anti-oxydante et anti-inflammatoire des extraits organiques et aqueux des racines de *L conifera*.

IV.4.2. Matériel et méthodes

IV.4.2.1. Evaluation in vitro de l'activité anti-oxydante

L'étude de l'activité anti-oxydante des différents extraits/fractions des racines de *L conifera* a été déterminée à l'aide des tests suivants : DPPH, CUPRAC et β -Carotène.

Six dilutions de chaque extrait ont été préparées à partir de la solution mère (1mg/ml méthanol): 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

a) Test de piégeage du radical DPPH

➤ **Principe**

L'activité anti-radicalaire libre des échantillons a été mesurée en utilisant le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), selon la méthode décrite par Blois. (1958). La réduction de ce radical en présence de composés antioxydants, s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune.

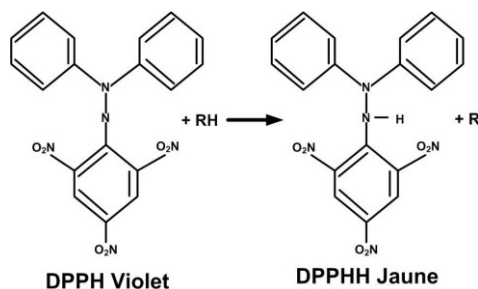


Figure 44 : Transformation du radical DPPH• en DPPHH

➤ **Mode opératoire**

Dans une microplaque à 96 puits, 40µl de chaque extrait à différentes concentrations (de 3.125 à 200µg/ml) est mis en présence de 160µl d'une solution DPPH préparée à l'avance en dissolvant 6mg de DPPH dans un volume de 100ml de méthanol. Le BHT et le BHA préparés dans les mêmes conditions, sont utilisés comme standards antioxydants et pour chaque concentration le test est répété 3 fois. La lecture de l'absorbance est faite à 517nm après 30min d'incubation dans l'obscurité contre un blanc identiquement préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en IC₅₀ (µg/ml) qui correspond à la quantité de chaque extrait nécessaire pour inhiber les radicaux libres à 50%. Les valeurs des IC₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des extraits testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, ce dernier est calculé par la formule suivante :

$$I(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100$$

Avec :

I % : Le pourcentage d'inhibition

*A*₀ : Absorbance de solution de DPPH sans extrait (contrôle négatif)

A : Absorbance en présence d'extrait ou standard (échantillon)

b) Activité de blanchissement du β -carotène

➤ **Principe**

L'évaluation de la capacité antioxydante par le test de blanchissement du β -carotène a été réalisée suivant le protocole décrit par Marco. (1968). Dans ce test on mesure l'inhibition de la décoloration du β -carotène qui résulte du piégeage des radicaux formés au cours de l'auto-oxydation de l'acide linoléique.

➤ **Mode opératoire**

Une quantité de 0.5mg de β -carotène a été dissoute dans 1ml de chloroforme. Ce mélange a été ensuite transféré dans un ballon contenant un volume de 200 μ l Tween 40 et 25 μ l d'acide linoléique pour être évaporé au rotavapor (BUCHI). Après évaporation du chloroforme, 50ml d'eau distillée oxygénée (barboter à l'oxygène pendant 30min avec un débit de 100ml/min) ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. Au volume de 160 μ l de l'émulsion β -carotène/acide linoléique préparée est additionné 40 μ l de chaque extrait de plante ou de l'antioxydant de synthèse (BHA et BHT) à différentes concentrations.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence ou non d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 25 μ l de méthanol) est mesurée à 470nm avant et après incubation à 50°C aux temps : T0, 30, 60, 90 et 120min.

➤ **Expression des résultats**

L'activité anti-oxydante de chaque échantillon a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$AA(\%) = [1 - (AH_0 - AH_t) / (AC_0 - AC_t)] \times 100$$

AA (%) : Activité antioxydante;

AH₀: valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de l'extrait mesurée à t=0;

AC₀: valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=0;

AH_t: valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de l'extrait mesurée à t=120 mn

AC_t: valeur de l'absorbance de la β -carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=120 mn

c) Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

➤ **Principe**

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity) décrite par Apak et al. (2004). Ce test est basé sur les modifications des caractéristiques d'absorption du complexe néocuproïne (Nc) cuivre (II) lorsqu'il est réduit par un antioxydant. Le potentiel de réduction de l'échantillon ou de l'étalon convertit

Partie pratique IV.4. Etude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de *L. confiera*

efficacement Cu^{+2} en Cu^{+1} , changeant ainsi l'absorbance maximum (Fig 45). Ce complexe de cuivre réduit donne une absorption maximum à 450 nm.

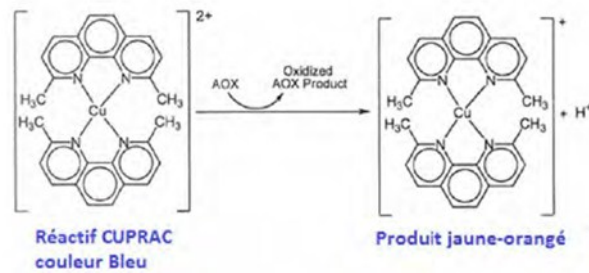


Figure 45 : Réduction du complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc

➤ Mode opératoire

Sur une plaque de 96 puits, 40 μl des dilutions de chaque extrait sont répartis, auxquels sont additionnés, 50 μl CuCl_2 (10mM), 50 μl de neocuprine (7.5mM) et 60 μl de solution tampon acétate d'ammonium (1M, pH = 7.0).

Après 1h d'incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 450nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles du BHA et du BHT.

➤ Expression des résultats

Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) correspondant à la concentration indiquant 0.50 d'absorbance.

IV.4.2.2-.Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de la plante a été effectuée selon la méthode de [Kandikattu. \(2013\)](#) avec de légères modifications.

Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA, provoquée par la chaleur (72°C), par les extraits de la plante. A 0.5ml de chaque concentration d'extrait ou du standard (volarène 75mg), on ajoute 0.5 ml de solution de BSA (0.2%) préparé dans le Tris-phosphate (pH 6.8). Les échantillons ont été incubés en premier lieu dans une étuve à 37 C° pendant 15min, puis dans un bain marie à 72°C pendant 5min. Après refroidissement des tubes, la turbidité est mesurée à 660 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit:

$$I\% = \frac{DO \text{ Contrôle} - (DO \text{ Extrait} - DO \text{ Blanc})}{DO \text{ Contrôle}} \times 100$$

Partie pratique IV.4. Etude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de *L. conifera*

- Blanc : 0.5ml extrait + 0.5 ml tris-phosphate (pH : 6.8)
- Contrôle : 0.5 H₂O + 0.5 ml BSA

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le voltarène 75mg.

Remarque : Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne \pm SEM des trois essais.

IV.4.3. Résultats

IV.4.3.1. Activités anti-oxydantes

Les résultats de l'activité antioxydante déterminée à l'aide des tests DPPH, CUPRAC et β -carotène sont résumés dans le Tableau 36. Les valeurs IC₅₀ et A_{0.5} sont inversement liées à la capacité antioxydante d'un composé donc plus la valeur d'IC₅₀ ou A_{0.5} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée.

D'après nos résultats, nous constatons que l'extrait d'acétate d'éthyle de *L. conifera* a présenté une activité anti-oxydante plus élevée dans les trois tests, que celle des autres extraits.

Tableau 36. Activités antioxydantes des extraits/fractions des racines de *Leuzea conifera*

Extrait/fraction	DPPH ¹	β -Carotene ¹	CUPRAC ¹
	IC ₅₀ μ g/mL	IC ₅₀ μ g/mL	A _{0.5} μ g/mL
Extrait brut	144.61 \pm 0.74 ^{a,b}	17.07 \pm 0.43 ^{a,b}	70.81 \pm 0.62 ^{a,b}
Dichlorométhane	65.57 \pm 0.39 ^{a,b}	12.99 \pm 0.22 ^{a,b}	18.98 \pm 0.41 ^{a,b}
Acétate d'éthyle	23.26 \pm 0.36	7.24 \pm 0.25 ^a	11.25 \pm 0.27 ^{a,b}
Butanol	125.23 \pm 0.56 ^{a,b}	21.89 \pm 0.31 ^{a,b}	40.92 \pm 0.52 ^{a,b}
Macérât	> 200	20.70 \pm 0.16 ^{a,b}	133.56 \pm 0.65 ^{a,b}
Décocté	180.21 \pm 0.61 ^{a,b}	16.08 \pm 0.26 ^{a,b}	138.54 \pm 0.51 ^{a,b}
BHT ^{2,3}	22.32 \pm 0.36 ^b	1.05 \pm 0.03 ^b	9.62 \pm 0.31 ^b
BHA ^{2,4}	5.73 \pm 0.21 ^a	0.90 \pm 0.05 ^a	3.64 \pm 0.15 ^a

¹IC₅₀ et A_{0.5}. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. Test de Tukey: ^aP < 0.05 comparé au BHT. ^bP < 0.05 comparé au BHA

²Standards.

³Butylhydroxytoluène.

⁴Butylhydroxyanisole

IV.4.3.2. Activité anti-inflammatoire

Le Tableau 37 montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux et organiques des racines de *L. conifera*.

Nous remarquons que le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA (0.2%) est proportionnel à la concentration des différents extraits de la plante où le pourcentage le plus élevé a été enregistré dans la fraction acétate d'éthyle et le décocté à la concentration 5000ppm, avec 97.48 ± 0.68 et 92.46 ± 0.22 respectivement. Ces valeurs sont proches de celle obtenue pour le voltarène (75mg) qui est un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard et qui a empêché totalement la dénaturation de BSA à la même concentration.

Tableau 37 : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits/fraction des racines de *Leuzea conifera*

PPM	% Inhibition ¹			
	5000	1500	1250	625
Extrait brut	47.60±0.39 ^a	36.00±0.44 ^a	20.41±0.25 ^a	14.14±0.34 ^a
Dichlorométhane	79.96±0.65 ^a	46.75±0.49 ^a	36.18±0.4 ^a	5.98±0.38 ^a
Acétate d'éthyle	97.48±0.68	31.47±0.54 ^a	15.36±0.42 ^a	2.75±0.5 ^a
Butanol	23.81±0.39 ^a	23.44±0.18 ^a	7.7±0.32 ^a	5.03±0.68 ^a
Macérât	69.51±0.69 ^a	50.59±0.53 ^a	39.16±0.93 ^a	26.31±0.5 ^a
Décocté	92.46±0.22 ^a	86.43±0.54 ^a	43.27±0.99 ^a	23.85±0.5 ^a
Voltarène² (75mg)	100±0.18	92±0.15	61±0.15	37±0.18

¹Les valeurs représentent la moyenne±SEM. Test de Tukey: *P < 0.05 comparé à voltarène.

²Standard.

IV.4.3. Discussion

➤ Activité anti-oxydante

Bien que les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie lithiasique soient mal connus, il y a des études qui montrent que la génération des radicaux libres et le développement du stress oxydatif sont liés à la formation des calculs oxalocalciques idiopathiques (Naghii et al, 2014).

Une concentration élevée de l'oxalate dans les fluides humains peut provoquer divers troubles pathologiques, notamment l'hyperoxalurie, la cardiomyopathie, les troubles de la conductance cardiaque, l'insuffisance rénale et, en particulier, la néphrolithiase à l'oxalate de calcium. Dans des conditions d'hyperoxalurie, le dépôt de cristaux entraîne l'activation de l'angiotensine II (Ang II). La NADPH Oxydase est stimulée par l'Ang II activé, conduisant à la production de EROs, qui peuvent endommager les cellules rénales (Khan, 2005).

Le rein est un organe très vulnérable aux dommages causés par les radicaux libres qui entraînent également un dysfonctionnement mitochondrial et la libération de facteurs pro-apoptotiques à partir des mitochondries dépolarisées qui entraînent une apoptose entraînant une lésion rénale. Cette dernière facilite la rétention des cristaux d'oxalate de calcium et la croissance ultérieure en calculs rénaux (Selvam, 2002).

Récemment, de nombreux antioxydants ont été étudiés pour prévenir la néphrolithiase médiée par l'hyperoxalurie en réduisant considérablement le dépôt de cristaux de CaOx dans les reins. Plusieurs études ont montré que la vitamine E agit comme un excellent antioxydant pour le rein où elle maintient le niveau optimal des enzymes anti-oxydantes nécessaires pour protéger les tubes rénaux contre la peroxydation lipidique (Sumitra *et al*, 2005 ; Huang *et al*, 2009).

D'autres antioxydants naturels tels que l'apocynine, la phycocyanine, la fucoïdine, les gallotannines, la rotlérine, le lupéol, la curcumine, etc. ont fait l'objet de nombreuses études dans la prévention des cellules rénales et ils ont eu un effet significatif dans la lutte contre le stress oxydatif en particulier dans des conditions d'hyperoxalurie (Naghii *et al*, 2014). Ces découvertes indiquent un grand potentiel pour l'application thérapeutique d'antioxydants et de piègeurs de radicaux libres en tant que traitement alternatif ou complémentaire pour la prise en charge de la lithiase urinaire (Aggarwal *et al*, 2013).

Dans le présent travail, la fraction acétate d'éthyle, ayant une teneur importante en antioxydants phénoliques, a montré une activité de piégeage des radicaux DPPH la plus élevée. Cette capacité antioxydante, est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. Les polyphénols contenus dans nos extraits sont probablement responsables de cette activité antioxydante. En effet, ces composés peuvent agir comme réducteurs en donnant les électrons et en réagissant avec le DPPH pour les convertir en produit plus stable.

L'activité inhibitrice de peroxydation des lipides par nos extraits ont été évaluées par l'essai du blanchiment du β -carotène qui est fondé sur la perte de la couleur jaune de β -carotène due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation d'acide linoléique dans une émulsion. Cependant, la présence d'antioxydants dans nos extraits pourrait minimiser l'oxydation du β -carotène (Bahorun *et al*, 1996). Cette inhibition peut être due à la capacité des composés phénoliques de libérer l'hydrogène. En effet, plusieurs études portant sur les plantes médicinales, montre une corrélation entre la teneur en composés phénolique des extraits et l'activité antioxydante dans le test β -carotène / acide linoléique (Loganayaki *et al*, 2013; Maisarah *et al*, 2013).

Pour ce qui est du test CUPRAC, est une analyse basée sur une réaction de transfert d'électron, surveillée par un changement de couleur quand l'oxydant est réduit. Les résultats obtenus montrent une activité antioxydante importante de la fraction acétate d'éthyle. Cette haute activité est évidemment causée par une teneur élevée en phénols et en flavonoïdes totaux. Plusieurs auteurs ont signalé que l'activité anti-oxydante des extraits de plantes

dépend de la quantité des composés phénoliques dans les extraits (Surveswaran *et al*, 2007; Makris *et al*, 2007; Hua Li *et al*, 2008; Angelov *et al*, 2008; Bozan *et al*, 2008). Cette bonne activité antioxydante peut être liée au nombre de groupes hydroxyles (Rice-Evans *et al* 1996), et à leur position dans la molécule ainsi qu'à la nature des composés phénoliques qui peuvent agir en synergie (Cirico *et Omaye*, 2006).

➤ **Activité anti-inflammatoire**

Une augmentation de l'élimination urinaire d'oxalate (hyperoxalurie) va conduire à une sursaturation de l'ultrafiltrat en oxalate et à la formation de cristaux d'oxalate de calcium. Cette hyperoxalurie peut se compliquer par des épisodes de lithiase d'oxalate de calcium ou alors par des dépôts diffus d'oxalate de calcium avec inflammation tubulo-interstitielle concomitante (Muji *et al*, 2015).

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux et organiques des racines de *L. conifera*, nous avons opté pour la méthode de la dénaturation protéique suite à l'augmentation de la température (Kandikattu, 2013). Le mécanisme possible de cette dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Mizushima *et al*, 1968 ; Barros *et al*, 2008). *In vivo*, cette dénaturation provoque l'induction de la réaction inflammatoire par la production des auto-antigènes (Barros *et al*, 2008 ; Bagad *et al*, 2011).

D'après nos résultats, on trouve que le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine, par les différents extraits des racines de *L. conifera*, est proportionnel à la concentration. Les extraits, acétate d'éthyle et le décocté, aux concentrations de 5000 et 1500 ppm ont donné une meilleure inhibition de la dénaturation de BSA et qui est proche de celle du voltarène (7mg), un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard, qui a exercé un pourcentage d'inhibition de 100% à la même concentration.

Cet effet bénéfique peut être dû à la présence des polyphénols dans les extraits de racines de *L. conifera*. Les différentes études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les polyphénols diminuaient les marqueurs de l'inflammation (Gonzalez-Gallego *et al*, 2010) et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation (Santangelo *et al*, 2007).

IV.4.4. Conclusion

On peut conclure que les racines de *L conifera* ont de très fortes activités antioxydante et anti-inflammatoire. Ces activités biologiques sont fonction de la présence des composés phénoliques. Cet effet bénéfique peut empêcher la rétention cristalline et donc la formation des calculs urinaires.

Cette partie de la thèse a fait l'objet d'une publication parue en 2020 dans South African Journal of Botany.

Conclusion
et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Notre objectif est de contribuer à l'étude de la lithiase urinaire dans notre pays afin de formuler une image réelle de son épidémiologie à travers une investigation prospective réalisée au niveau la région Est Algérien. En outre, une approche préventive basée sur l'effet litholytique d'une plante médicinale a été réalisée dans le but d'éviter la récurrence et/ ou la survenue des complications rénales.

En premier lieu, on a réalisé une étude morpho-constitutionnelle sur 953 calculs urinaires collectés au niveau de la région Est Algérien et on a constaté que la lithiase oxalocalcique est prédominante. Pour cette raison notre intérêt s'est fixé sur ce type de calcul où on a déterminé par la suite, la fréquence de chaque sous type et étiologies associées. Le résultat ainsi obtenu montre que c'est l'hypercalciurie idiopathique qui prédomine. On a cependant établi des orientations étiologiques pour cerner au plus l'origine de ces hypercalciuries. Il s'est avéré qu'une bonne proportion de ces calculs oxalocalciques majoritaires a été initiée par des calcifications au niveau de l'épithélium rénal communément appelées « plaque de Randall ». Cette plaque constitue le support qui permet l'ancrage et la croissance de ce type de calcul et favorise la récurrence de leur formation.

En second lieu, on a montré l'importance du suivi des patients lithiasiques dont ceux qui ont une lithiase d'origine congénitale comme le cas d'hyperoxalurie primaire (découverte après l'analyse morphologique du calcul), en vue de prévenir ou du moins ralentir leur récurrence qui, dans le cas contraire et extrême, peut entraîner une insuffisance rénale terminale. Pour ce faire, on a établi un bilan biologique à partir duquel on ajuste la prise en charge préconisée. L'analyse de la cristallurie, notamment celle réalisée sur des urines fraîches du réveil, permet d'identifier les différents faciès cristallins et de faire ressortir les principales étiologies qui leurs sont associées.

Notre travail s'est finalement orienté vers le domaine de la lithiase et phytothérapie où l'on a constaté un engouement des patients lithiasiques vers des pratiques phytothérapeutiques, qui sont d'ailleurs bien ancrés dans les mœurs de notre société, pour se soigner de la lithiase urinaire. L'utilisation des plantes reste cependant aléatoire et sans fondement scientifique qui se base sur la connaissance parfaite du type de calcul à traité. Dans cette partie, on a choisi une plante non étudiée (mais utilisée traditionnellement comme plante anti lithiasique), *Leuzea conifera* L (Asteraceae), sur laquelle on a testé l'activité litholytique sur 2 types de calculs urinaires dont l'oxalate de calcium monohydraté C1 (le type le plus fréquent) et la cystine (lithiase d'origine congénitale, fortement récidivante et pH dépendante). Les résultats

Conclusion générale et perspectives

obtenus montrent en premier que l'extrait de cette plante a un effet litholytique probant sur les calculs cystiniques. Pour les calculs de whewellite C1 le maintien en solution d'extrait aqueux de notre plante a engendré plutôt un gain massique qui s'est avéré en rapport avec la formation d'un dépôt surfacique de brushite (identifié par FTIR et MEB).

Après avoir constaté l'inefficacité de la dissolution des calculs de whewellite par notre extrait de plante on a poussé notre étude à l'échelle des cristallites pour avoir une idée plus exhaustive des mécanismes d'inhibition mis en jeu. Pour ce faire, on a réalisé une étude in vitro de l'effet des extraits/fractions de notre plante sur les différentes étapes de cristallisation de la whewellite (nucléation, croissance et agrégation des cristaux de C1) et éventuellement leur apport dans la formation d'autres types de cristaux autres que C1. Plusieurs extraits de notre plante ont été alors préparés et le résultat de l'étude entreprise a montré que c'est le décocté des racines de *L conifera* qui est le plus efficace en termes d'inhibition cristalline. Cet effet inhibiteur étant très important et se manifeste aussi bien en phase de germination (Nombre de cristaux de C1 fortement diminué, à 0.5mg/ml) qu'en phase de croissance car les cristallites de C1 formés restent à dimension relativement réduite. Cette étude nous a aussi permis de constater, en ce qui concerne le macérât aux concentrations élevées (1mg/ml) une cristallisation de weddellite C2 au dépend de celle de la whewellite C1. Ces cristaux de C2, formés dans un contexte d'hyperoxalurie favorisant normalement la cristallisation de C1, sont assez nombreux mais restent de taille moyenne relativement réduite. Ce type d'alternance (formation des cristaux de C2 de faible taille au dépend des cristaux de C1 et de leurs agrégats) présente en soit une alternative intéressante pour prévenir la lithiase urinaire oxalate dépendante. En effet, une telle cristallisation est avantageuse dans le traitement préventif de la lithiase urinaire, dans le sens où elle induit l'excrétion de petits cristaux évitant ainsi leur rétention, première étape du processus lithiasique.

En plus de la formation des cristaux et des calculs d'oxalate de calcium, l'exposition à une hyperoxalurie provoque aussi l'altération des cellules rénales suite à la formation des radicaux libres. Ces derniers sont impliqués dans diverses pathologies, et la recherche de nouvelles molécules pouvant pallier le déficit du système de défense endogène s'est largement intensifié. Notre étude a permis de mettre en évidence les activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits/fractions des racines de *L conifera*.

En perspectives, de nombreux travaux restent à effectuer sur ces différents points.

- Au niveau de l'épidémiologie :

Conclusion générale et perspectives

- une étude plus approfondie sur les lithiases spécifiques (lithiase de l'enfant, lithiase héréditaire, lithiase chez les personnes âgées)
- une enquête étiologique, doit être réalisée, pour tout patient lithiasique, comprenant l'analyse morpho-constitutionnelle du calcul urinaire et une analyse biologique pour mettre en évidence les facteurs de risque de la lithiase
- des investigations complémentaires sur les habitudes alimentaires sont nécessaires pour confirmer leur implication dans les processus lithiasiques.
 - Pour la plante médicinale, il est nécessaire de :
 - isoler et identifier le/les principes actifs responsables de l'effet anti-lithiasique et de connaître son/leur mécanisme d'action
 - évaluer in vivo les effets curatif et préventif de la plante
 - vérifier in vivo, sur des patients lithiasiques, les effets anti-lithiasique et diurétique de cette plante sur les différents types de calculs urinaires.

Finalement, il y a lieu d'étudier les effets, litholytique et inhibiteur, d'autres plantes de la pharmacopée locale sur les cristaux et calculs urinaire.

Références
Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbassene, F., Maizia, A., Messaoudi, N., Bendahmane, L., Boukharouba, H., Daudon, M., Addou, A., 2020.** Lithiase urinaire chez l'adulte dans l'ouest algérien : A propos de 1104 cas. *La Tunisie Médicale*; Vol 98 (n°05) : 396-403.
- Abdelmalek, F., Harrache, D., Addou, A., et al., 2001.** Étude par turbidimétrie de la cristallisation oxalocalcique en présence de quelques inhibiteurs. *Phys Chem* 4:96–107.
- Acquaviva-Bourdain, C., Bacchetta, J., Bensman, A et al., 2016.** Hyperoxalurie primitives. Un livret pour les patients et leurs familles. Bacchetta, Association AIRG-France.
- Agarwal, BN., Cabebe FG., 1980.** Renal acidification in elderly bjects. *Nephron*; 26:291–5.
- Aggarwal, A., Tandon, S., Singla, SK., Tandon, C., 2010.** Diminution of oxalate induced renal tubular epithelial cell injury and inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by aqueous extract of *Tribulus terrestris*. *Int Braz J Urol.* 36:480–489.
- Aggarwal, D., Sharma, M and Singla, S.k., 2013.** The role of natural antioxidants as potential therapeutic agent in nephrolithiasis. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 6, Issue 3, 48-53.
- Ahmed, S., Hasan, M., Mahamood, ZA., 2016.** Antiurolithiatic plants: Formulations used in different countries and cultures. *Pak J Pharm Sci.* 29(6):2129–2139.
- Akharaiyi, FC., Boboye, B., 2010.** Antibacterial and phyto-chemical evaluation of three medicinal plants. *J Nat Prod.* 3: 27-34.
- Alapont, Perez, FM., Galvez Calderon, J., VareaHerrero, J., Colome Borros, G., Olaso Oltra, A., Sanchez Bisono, JR., 2001.** Epidemiology of urinary lithiasis. *Actas Urol Esp*; 25:341—9.
- Alatab, S., Pourmand, G., El Howairis, M.F., Buchholz, N., Najafi, I., Pourmand, M.R., Mashhadi, R., Pourmand, N., 2016.** National Profiles Of Urinary Calculi: A Comparison Between Developing And Developed Worlds. *Iranian journal of kidney diseases*, 10(2): p. 51-61.
- Alaya, A., Hellara, I., Belgith, M., Nouri, A., Hellara, W., Neffati, F., Saad, H., Najjar, M.F., 2012.** Étude de la composition des calculs urinaires en fonction de l'âge dans la population du centre tunisien. *Prog urol* 22, 938—944.
- Amar, A., Harrache D., Atmani, F., Bassou, G., Grillon, F., 2010.** Effet de *Parietaria officinalis* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium, dans l'urine. *Phytothérapie.*, 8:342–347.
- Anderson, WAD., 1940.** Renal calcification in adults. *J Urol*; 44 : 29-34.
- Angelov, G., Boyadzhiev, L., Georgieva, S., 2008.** Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies*, 3(1), 143-150.

- Apak, R., Guclü , K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E., 2004.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.
- Archer, HE., Dormer, AE., Scowen, EF., Watts, RW., 1957.** Studies on the urinary excretion of oxalate by normal subjects. *Clin Sci*. Aug;16(3):405-11.
- Asper, R., 1984.** Epidemiology and socioeconomic aspects of urolithiasis. *Urol Res*; 12:1–5.
- Asplin, JR., Lingeman, J., Kahnoski, R., Mardis, H., Parks, JH., Coe, FL., 1998.** Metabolic urinary correlates of calcium oxalate dehydrate in renal stones. *J Urol*; 159: 664-8.
- Atmani, F., et Khan, SR., 2000.** Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *British Journal of Urology International*; 85:621-5.
- Atmani, F., Opalko, FJ., Khan ,SR., 1997.** Cellular membranes present in the whole human urine promote heterogeneous nucleation of calcium oxalate crystals. In: Jungers, P., Daudon, M. *Renal Stone Disease. Crystallization process, pathophysiology, metabolic disorders and prevention.* Paris, Elsevier, pp. 143-144.
- Bagad, Y.M., Umarmkar, A.R., Tatia, A.U., Surana, S.J., 2011.** Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Brideliaairyshawii* (Euphorbiaceae). *J pharm Res*;4(5):1326- 1332.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, JC., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel Forschung*; 46 (11):1086–1089.
- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R., 2008.** Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.* 111, 61–66.
- Beghalia, M., Ghalem, S., Allali, H., Belouatek, A., Marouf, A., 2007.** Effect of herbal extracts of *Tetraclinis articulata* and *Chamaerops humilis* on calcium oxalate crystals in vitro. *Gomal Journal of Medical Sciences.*, Vol. 5, No. 2.
- Belostotsky, R., Seboun, E., Idelson, G.H., Milliner, D.S., Becker-Cohen, R., Rinat, C., et al., 2010.** Mutations in DHDPSL are responsible for primary hyperoxaluria type III. *Am J Hum Genet*; 87:392–9.
- Ben ammar, S., Kamoun, A., Zerelli, L., Zghal, A., Belkahia, C.M., Lakhoua, R., 1993.** Les hyperoxaluries : aspects biochimiques, cliniques et thérapeutiques. *Revue maghrébine de pédiatrie*, 3, 2 : 59-63.
- Benalia, H., Djeridane, A., Bensafieddine, F., Yousfi, M., 2016.** High in vitro antiurolithiatic effect of *Pituranthos scoparius* roots extracts. ISSN: 1827-8620. *Archives*, vol.1, 31-43.

- Bensekrane, B., Gallart-Mateu, D., de La Guardia, M., Harrache, D., 2015.** Effets des extraits de noyaux de dattes *Phoenix dactylifera* L sur la cristallisation de la brushite dans l'urine totale. *Phytothérapie*, 13:2-13.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D., 2005.** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal chem.* 82, 390-393.
- Blois, M.S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
- Boistelle, R., 1985.** Concepts de la cristallisation en solution. *Actual Nephrol Necker Hosp ;* 15:159—202.
- Borghi, L., Ferretti, PP., Elia, GF., Amato, F., Melloni, E., Trapassi, MR., et al., 1990.** Epidemiological study of urinary tract stones in a northern Italian city. *Br J Urol;* 65:231—5.
- Boulanger, H., Flamant, M., 2013.** Hypercalciurie, EMC - Appareil locomoteur, 14-027-P-10, Volume 8> n°1 > .
- Bouquet, A., 1972.** Plantes médicinales du Congo Brazzaville. Ed. O.R.S.T.O.M.
- Bousslama, S., Boutefnouchet, A., Hannach, B., Djemil, T., Kadi, Dahdouh, A., Saka, S., Daudon, M., 2015.** Détermination de la composition de 359 calculs du haut appareil urinaire collectés dans la région Est-algérien. *Prog Urol;* 26: 41-49
- Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M C., Ayachi, A., 2011.** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *L'aubepine monogyne*. *Lebanese Science Journal*, 12 (1), 59-69.
- Bouزيد, H., Majdoub, A., Daudon, M., Najjar, M.F., 2016.** Hyperoxalurie primitive : une revue de la littérature. *Néphrologie & Thérapeutique. NEPHRO-881;* No. of Pages 6.
- Bozan, B ., Tosun, G., Ozcan, D., 2008.** Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxydant activity. *Food chemistry*, 209, 426-430.
- Breslau, NA., Sakhaee, K., 1987.** Pathophysiology of non hypercalciuric causes of stones. In : PAK CYC, *Renal stone disease : Pathogenesis, Prevention and treatment*, Martinus Nijhoff Publish; pp. 47-84
- Bruneton, J. 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 4 e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc , pp.1288.
- Bruneton, J., 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed .2, Lavoisier, 895 p.
- Caquet, R., 2015.** 250 examens de laboratoire. Elsevier Masson. 12e édition. 576 pages. Pages 18.
- Castiglione, V., Jouret, F., Bruyère , O., Dubois, B., Thomas, A., Waltregny, D., Bekaert, A-C., Cavalier, E., Gadisseur, R., 2014.** Epidémiologie de la lithiase urinaire

en Belgique sur base d'une classification morfo-constitutionnelle. *Néphrologie & Thérapeutique*.G Model NEPHRO-751; No. of Pages 8.

Cathignol, D., Tavakkoli, J., Mestas, J.L., 2000. Lithotritie extracorporelle. ITBM-RBM; 21 : 4-10 0 2000 Aditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.

Chizzola, R., 2012. Metallic Mineral Elements and Heavy Metals in Medicinal Plants. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 6 (Special Issue 1), 39-53. Global Science Books.

Cifuentes-Delatte, L., Minon-Cifuentes, J., Medina, JA., 1987. New studies on papillary calculi. *J Urol*; 137:1024-9.

Cifuentes-Delatte, L., Minon-Cifuentes, J., Medina, JA., 1985. Papillary stones: calcified renal tubules in Randall's plaques. *J Urol*;133: 490-4.

Cioppi, F., Taddei, L., Brandi, M.L., and Croppi, E., 2009. Idiopathic hypercalciuria and calcium renal stone disease: our cases. *Clin Cases Miner Bone Metab.* Sep-Dec; 6(3): 251–253.

Cirico, T.L., Omaye, S.T., 2006. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low-density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol* 44(4):510–6.

CLAFU., 1996. Comité de la Lithiase de l'Association Française d'Urologie. Bilan métabolique d'une lithiase urinaire en pratique courante. *Progrès en Urologie*, 6, 955-962.

Cochat, P., Fargue, S., Bacchetta, J., Bertholet-Thomas, A., Sabot, JF., Harambat, J., 2011. Hyperoxalurie primitive. *Néphrologie & Thérapeutique* 7, 249–259.

Cochat, P., Rumsby, G., 2013. Primary hyperoxaluria. *N Engl J Med*;369:649-58.

Cohen-Solal, F., Lacour, B., Jungers, P., Daudon, M., 2001. Particularités morphologiques et composition des calculs urinaires induits par des maladies inflammatoires du tube digestif. In : *Rein et tube digestif, XXIIe Symposium Gambro, Gambro*, pp. 90-97.

Cotton, F., Wolff, F., Simon, I., Idrissi, M., Tielemans, C., Vanden Bossche, M., Roumequère, T., et Pozdzik, A., 2014. Apport de la biologie clinique dans l'exploration étiologique et le suivi de l'urolithiase. *Rev Med Brux*; 35 : 243-9.

Courbebaisse, M., Prot-Bertoye, C., Bertocchio, J.-P., Baron, S., Maruani, G., Briand, S., Daudon, M., Houillier, P., 2016. Lithiase rénale de l'adulte : des mécanismes au traitement médical préventif. *La Revue de médecine interne* 38 44–52.

Cramer, S.D., Ferree, P.M., Lin, K., Milliner, D.S., Holmes, R.P., 1999. The gene encoding hydroxypyruvate/glyoxylate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. *Hum Mol Genet*;1446:383–8.

Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. 1262 pp. 1981. ISBN 0-231-03880-1. Columbia University Press, New York.

Daudon, M., 2000. L'analyse morfoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant. *Arch. Pédiatr*; 7 : 855-865.

- Daudon, M., Bouzidi, H., Bazin, D., 2010.** Composition and morphology of phosphate stones and their relation with etiology. *Urol Res*;38:459–67.
- Daudon, M., 1989.** Mécanisme de la lithogénèse. In : Jungers P, Daudon M, Le Duc A, editors. *Lithiase Urinaire*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. p. 114-57
- Daudon, M., 1989.** Modèles de cristallisation. In: Jungers P, Daudon M, Le Duc A, editors. *Lithiase urinaire*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. p. 158–95.
- Daudon, M., 2000.** Component analysis of urinary calculi in the etiologic diagnosis of urolithiasis in the child. *Arch Pediatr*; 7: 855– 65.
- Daudon, M., 2002.** Cristallurie. In: Kamoun P, Fréjaville JP, editors. *Guide des examens de laboratoire*. Paris: Flammarion Me´decine Sciences. p. 1274–303.
- Daudon, M., 2003.** Évolution de la composition et de la localisation des calculs chez le sujet âgé. *Feuillets Biol*;251:51—4.
- Daudon, M., 2004.** Épidémiologie de la lithiase urinaire. In: Doré B, editor. *Les lithiasesrénales*. Paris: Springer-Verlag. p. 7–32.
- Daudon, M., 2005.** Épidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. *Annales d’urologie* 39 209–231
- Daudon, M., 2013.** Lithogénèse. EMC-Urologie. Volume 6> n^o 4.
- Daudon, M., 2014.** La cristallurie: le point de vue du biologiste. Service de Biochimie A, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris.
- Daudon, M., Bazin, D., Letavernier, E., 2015.** Randall's plaque as the origin of calcium oxalate kidney stones., *Urolithiasis*; 43: 5-11.
- Daudon, M., Bounxouei, B., Santa Cruz, F., Leite da Silva, S., Diouf, B., Angwafoo , 3rd ,FF., et al., 2004.** Composition des calculs observés aujourd’hui dans les pays non industrialisés. *ProgUrol* ; 14:1151–61.
- Daudon, M., Cohen-Solal, F., Barbey, F., Gagnadoux, M.F., Knebelmann, B., Jungers, P., 2003.** Cystine crystal volume determination: a useful tool in the management of cystinuric patients. *Urol Res*; 31 : 207-11.
- Daudon, M., Cohen-Solal, F., Jungers, P., 2000.** Mécanisme de la lithogénèse et de la cristallurie. *Biologie et santé*, volume 1, n1
- Daudon, M., Cohensolal, F., Lacour, B., 2004.** Apport de la morphologie des calculs au diagnostic étiologique des lithiases urinaires. Service de Biochimie A, Hôpital Necker, Paris. Paru dans : *Feuillets de Biologie* ; 35 : 5157.
- Daudon, M., Donsimoni, R., Hennequin, C., Fellahi, S., Le Moel, G., 1995.** Paris M, et al. Sex- and age-related composition of 10 617 calculi analyzed by infrared spectroscopy. *Urol Res*; 23:319–26.

- Daudon, M., Doré, J.C., Jungers, P., Lacour, B., 2004.** Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multi-variate epidemiological approach. *Urol Res*;32 (3):241—7.
- Daudon, M., Estépa, L., Lacour, B., Jungers, P., 1998.** Unusual morphology of calcium oxalate calculi in primary hyperoxaluria. *J Nephrol*; 11: S-1, 51-55
- Daudon, M., Reveillaud, R.J., 1985.** Revue critique des méthodes d'analyse des calculs urinaires. In : Crosnier J, Funck-Brentano JL, Bach JF, Grunfeld JP (eds), *Actualités néphrologiques de l'hôpital Necker*, Paris, Flammarion Médecine-Sciences, pp 203-80.
- Daudon, M., Frochot, V., Bazin, D., Jungers, J., 2016.** Crystalluria analysis improves significantly etiologic diagnosis and therapeutic monitoring of nephrolithiasis. *C. R. Chimie* 19, 1514e1526.
- Daudon, M., Hennequin, C., Bader, C., Jungers, P., Lacour, B., Druke, T., 1994.** inhibiteurs de cristallisation dans l'urine. *ActualNephrol*; 24 : 165-220.
- Daudon, M., Jungers, P., Lacour, B., 2004.** Intérêt clinique de l'étude de la cristallurie. *Ann Biol Clin*; 62 : 379-393.
- Daudon, M., Knebelmann, B., 2011.** 70% DES CALCULS, Lithiase oxalocalcique. Dossier lithiase urinaire. *Rev Prat*;61:385—8.
- Daudon, M., Letavernier, E., Frochot, V., Haymann, J.P., Bazin, D., Jungers, P., 2016.** Respective influence of calcium and oxalate urine concentration on the formation of calcium oxalate monohydrate or dihydrate crystals. *Comptes Rendus Chimie*; 19: 1504-1513.
- Daudon, M., Reveillaud, R.J., 1985.** Typage morphologique des calculs oxalocalciques et données etiopathogéniques. *Ann. Urol.* 19, 299-308.
- Daudon, M., Réveillaud, R.J., Normand, M., Petit, C., Jungers, P., 1987.** Piridoxilate-induced calcium oxalate calculi: a new drug- induced metabolic nephrolithiasis. *J Urol*; 138 : 258-261.
- Daudon, M., Traxer, O., Jungers, P., 2012.** *Lithiase Urinaire*, 2ème ed., Lavoisier, Médecine Sciences, Paris, 672 pages.
- Daudon, M., Traxer, O., Jungers, P., Bazin, D., 2007.** Stone morphology suggestive of Randall's plaque. In: Evan AP, Lingeman JE, Williams Jr JC, editors. *Renal stone disease*, vol. 900. Melville, New York: Am Inst Physics Conf Proceedings. p. 26-34.
- Daudon, M., Traxer, O., Lechevallier, E., Saussine, C., 2008.** Epidémiologie des lithiases urinaires. *Prog Urol*;18: 802—14.
- Daudon, M., Traxer, O., Lechevallier, E., Saussine, C., 2008.** La lithogénèse. *Progrès en urologie* 18, 815—827.
- Daudon, M., Traxer, O., Jungers, P., 2012.** *Lithiase Urinaire*, 2ème ed., Lavoisier, Médecine Sciences, Paris, 672 pages.

- Daudon, M., 2001.** Les lithiases urinaires secondaires à des maladies héréditaires. *Biologie & Santé* vol. 1, n° 2.
- Daudon, M., 2015.** Cristallurie. Expertise Médicale Continue en néphrologie. *Néphrologie & Thérapeutique* 11 174–190.
- De Bellis, R., Maria Piera Piacentini, Maria Assunta Meli, Michele Mattioli, Michele Menotta, Michele Mari, Laura Valentini, Letizia Palomba, Donatella Desideri, Laura Chiarantini., 2019.** *In vitro* effects on calcium oxalate crystallization kinetics and crystal morphology of an aqueous extract from *Ceterach officinarum*: Analysis of a potential antilithiatic mechanism. *PLoS ONE* 14(6): e0218734.
- Déchaux, M., 2011.** Hypercalciurie. page 86. Dans : Michèle Garabédian (MD.), Agnès Linglart, Eric Mallet, Anne Lienhardt-Roussie., 2011. *Métabolisme phosphocalcique et osseux de l'enfant*. 2ème édition. Médecine Sciences Publication. 204 pages.
- Deganello, S., Kampf, A.R., and Moore, P. B. 1981.** The Crystal Structure of Calcium Oxalate Trihydrate: $\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_2\text{O}_4)$. *Am. Mineral.*, 66, 859–865.
- Deyris, LA., El-Kaddi., 2000.** Calcium : Métabolisme et pathologie. Site internet de Paris Nord. Disponible sur <http://www.paris-nord-sftg.com/cr.calcium.image.htm>. Consulté le 01/04/2009.
- Djaroud, S., Harrache, D., 2013.** Étude de l'effet d'*Hordeum vulgare* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium dans l'urine. *Phytothérapie* 11:289-293.
- Djaroud, S., Harrache, D., Amar, A., 2012.** Effet in vitro de l'orge *Hordeum vulgare* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium monohydraté (whewellite). *Ann Biol Clin* 70:725–31.
- Djelloul, Z., Djelloul, A., Bedjaoui, A., Kaid-omar, Z., Attar, A., Dau-don, M., et al., 2006.** 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. *ProgUrol*;16:328—35.
- Djeridane, M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouna, P and Stocker, N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., 2003.** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull Soc Phrm. Bordeaux*; 142:61-78.
- Donsimoni, R., Hennequin, C., Fellahi, S., Troupel, S., Le Moel, G., Paris, M., Lacour, B., Daudon, M., 1997.** New aspects of urolithiasis in France. *Eur. Urol.*, 13, 229-234.
- Doremus, RH., Gardner, GL., Mckay, W., 1976.** Crystallization of calcium in various media and urolithiasis. In: Finalyson B, Thomas WC, *Colloquium on renal lithiasis*. University Presses of Florida, Gainesville, pp.18-32.
- Ekaete, DU., Ukana, DA., Itoro, EU., 2013.** Phytochemical screening and nutrient analysis of *Phyllanthus amarus*. *Asian Journal of Plant science and Research*; 3(4):116-122.

- El Kabbaj, S., Meiouet, F., EL Amrani, A., 2000.** Analyse des calculs urinaires par spectrophotométrie infrarouge à propos de 218 cas au Maroc. *Biologie & Santé* vol. 1, n° 1.
- Eruvbetine, D., 2003.** Canine Nutrition and Health. A paper presented at the seminar organized by Kensington Pharmaceuticals Nig. Ltd., Lagos on August 21.
- Evan, A.P., Lingeman, J.E., Coe, F.L., Parks, J.H., Bledsoe, S.B., Shao, Y., et al., 2003.** Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest*; 111:607—16.
- Evan, AP., Lingeman, JE., Coe, FL., Bledsoe, SM., Shao, Y., Lingeman, JE et al., 2008.** Role of interstitial apatite plaque in the pathogenesis of the common calcium oxalate stone. *Semin Nephrol*; 28: 111-119.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- Farmanesh, S., Ramamoorthy, S., Chung, J., 2013.** Specificity of growth inhibitors and their cooperative effects in calcium oxalate monohydrate crystallization. *J Am Chem* 136:367–76
- Felix, G., Adrian, R., Antonia, CB., 2015.** Efficacy of mixtures of magnesium, citrate and phytate as calcium oxalate crystallization inhibitors in urine. *J Urol* 194:1–8
- Férraille, E., 2002.** Le bilan biologique : un outil indispensable pour la prise en charge des patients lithiasiques. *Rev Med Suisse* , volume -2. 22628
- Ferraro, P.M and Gambaro, G., 2012.** The Genetics of Kidney Stones. J.J. Talati et al. (eds.), *Urolithiasis*. p142.
- Fleisch, H., 1978.** Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int*; 13: 361-371.
- Fournier, A., Bataille, P., 1991.** Monographie Lithiase rénale : Avant propos. *Rev. Prat.*, 21, 2011-2012.
- Gadisseur, R., Castiglione, V., Jouret, F., Bruyère, O., 2014.** Épidémiologie de la lithiase urinaire en Province de Liège. *Néphrologie & Thérapeutique* 10 (5):270. DOI: 10.1016/j.nephro.2014.07.326.
- Gadisseur, R., 2012.** Analyse Morpho-constitutionnelle des Lithiases, Centre Hospitalier du Bois de l'Abbaye et de Hesbaye. 21/05/2012.
- Gardner, G.L., Doremus, R.H., 1978.** Crystal growth inhibitors in human urine: effect on calcium oxalate kinetics. *Invest Urol*; 15 : 478-485
- Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S. et Tunon, M.J., 2010.** Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br. J. Nutr.*, 104:S15-S27.
- Graf, J, D., et Férraille, E., 2000.** Importance de l'analyse du calcul dans l'exploration de la lithiase rénale. *Revue Médicale Suisse*. Numéro : 2289. Sujet: Néphrologie.

- Grases, F., Millan, A., Conte, A., 1990.** Production of calcium oxalate monohydrate, dihydrate or trihydrate. A comparative study. *Urol. Res.* 18, 17-20.
- Griffith, DP., Osborne, CA., 1987.** "Infection (Urease) Stones," *Mineral and Electrolyte Metabolism*, Vol. 13, No. 4, pp. 278-285.
- Gupta, J., Amit Gupta, A., Gupta, A.K., 2014.** Determination of trace metals in the stem bark of *Moringa oleifera Lam.* *IJCS*; 2(4): 39-42
- Hallson, PC., Rose, GA., Sulaiman, S., 1982.** Magnesium reduces calcium oxalate crystal formation in human whole urine. *Clin Sci*; 62: 17-23.
- Hammiche, V., Maiza, K., 2006.** Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of TassiliN'ajjer. *J. Ethnopharmacol*; 105 :358—367.
- Hannache, B., Bazin, D., Boutefnouchet, A., Daudon, M., 2012.** Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro : étude à l'échelle mésoscopique. *Prog Urol*;22 :577—582 .
- Harrache, D., Mesri, Z., Addou, A., Semmoud, A., Lacour, B., Daudon, M., 1997.** Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans l'ouest algérien par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. *Eurobiol*;31:69—74.
- Hennequin, C., Lacour, B., Daudon, M., 1993.** Les inhibiteurs de cristallisation. *Eurobiologiste* 203: 47–55
- Hesse, A., Brandle, E., Wilbert, D., Kohrmann, KU., Alken, P., 2003.** Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs 2000. *EurUrol*; 44:709–13.
- Hesse, A., Tiselius, H.G., Siener, R., Hoppe, B., 2009.** Urinary stones. Diagnosis, Treatment and Prevention of Recurrence. 3rd revised and enlarged edition. P3, 38, 39.
- Hochrein, O., Thomas, A., and Kniep, R., 2008.** "Revealing the Crystal Structure of Anhydrous Calcium Oxalate, CaC₂ O₄, by a Combination of Atomistic Simulation and Rietveld Refinement," *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie*, 634, 11, 1826–1829.
- Horn, F., Sternberg, M., 2005.** *Biochimie humaine*. Flammarion Médecine-Sciences.p : 391.
- Hovda, K.E., Guo, C., Austin, R., McMartin, K.E., 2010.** Renal toxicity of ethylene glycol results from internalization of calcium oxalate crystals by proximal tubule cells. *Toxicol Lett*; 192:365-72.
- Hua, Li., Xiaoyu, W., Peihong, Li., Yong, Li., Hua, W., 2008.** Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *J. Food & Drug Anal.*, 16 (6), 67-73.
- Huang, H.S., Ma, M.C., Chen, J., 2009.** Low-vitamin E diet exacerbates calcium oxalate crystal formation via enhanced oxidative stress in rat hyperoxaluric kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F34–F45.

- Huber, P.A., Birdsey, G.M., Lumb, D.T., Prowse., Perkins, T.J., Knight et Al., 2005.** Peroxysomal import of human alanine , glyoxylate aminotransferase requires ancillary targeting in formation remote from its c terminus , J. Biol, chem. 280 27111-27120.
- Itoh, Y., Yasui, T., Okada, A., Tozawa, K., Hayashi, Y and Kohri, K., 2005.** Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis. The Journal Of Urology. Vol. 173, 271–275.
- Johri, N., Jaeger, P., Ferraro, PM., Shavit, L., Nair, D., Robertson, WG et al., 2017.** Vitamin D deficiency is prevalent among idiopathic stone formers, but does correction pose any risk? Urolithiasis; 45: 535–543.
- Jungers, P et al., 1993.** Lithiase calcique en 1993 : quels bilans pour quels patients ? Sémin Uro-Néphrol Pitié 19 : 33-50.
- Jungers, P., Joly, D., Gagnadoux, M-F., Daudon, M., 2001.** Lithiase cystinique : physiopathologie et traitement médical. Progrès en Urologie, 11, 122-126.
- Jungers, P., 1989.** Epidémiologie de la lithiase urinaire In: Jungers P., Daudon M., Le Duc A. Lithiase urinaire. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, pp.1-34.
- Jungers, P., 2003.** Lithiase urinaire, Encycl Méd Chir (Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine, 5-0495, 7 p.
- Jungers, P., Daudon, M., Conort, P., 1999.** Lithiase rénale. Diagnostic et traitement. Paris : Flammarion Médecine-Sciences.
- Kahwati, LC., Palmieri Weber, R., Pan, H., Gourlay, M., Le Blanc, E., Coker-Schwimmer, M., et al., 2018.** Vitamin D, calcium, or combined supplementation for the primary prevention of fractures in community-dwelling adults: evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. JAMA; 319: 1600-1612.
- Kandikattu, K., Bharath Rathna Kumar, P., Venu Priya, R., Sunil Kumar, K., Ranjith Singh.B. Rathore., 2013.** Evaluation of anti-inflammatory activity of canthium parviflorum by in-vitro method. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology; 1(5): 729-730.
- Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugbuaja, V.O., 2004.** Identification of active principles of M. balsamina (balsam Apple) leaf extract. J Med Sci; 4(3):179-182.
- Khan, S.R., 2005.** Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. Urol Res 33: 349–357.
- Khan, SR., Hackett, RL., 1993.** Role of organic matrix in urinary stone formation: an ultrastructural study of crystal matrix interface of calcium oxalate monohydrate stones. J Urol; 150: 239—45.
- Khan, SR., Rodriguez, DE., Gower, LB., Monga, M., 2012.** Association of Randall plaque with collagen fibers and membrane vesicles. J Urol; 187:1094-100.

- Khitri, W., Lachgueur, N., Tasmaout, A., Lardjam, A et Khalfa, A., 2016.** Plantes antilithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie, Revue d'ethnoécologie.
- Khouchlaa, A., Talbaoui, A., El Yahyaoui El Idrissi, A., Bouyahya, A., Ait Lahsen, S., Kahouadji, A., Tijane, M., 2017.** Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique in vitro sur la lithiase urinaire d'extrait de *Zizyphus lotus* L. d'origine marocaine. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-017-1106-3.
- Kliegman, RM., 2000.** Urinary lithiasis Nelson textbook of pediatrics. St Louis: WB Saunders. p. 1655—58.
- Klimas, R., Bennett, B., Gardner, WA., 1985.** Jr Prostatic calculi: a review. *Prostate*. 7(1):91–6.
- Kourilsky, O., 2014.** Lithiase rénale. Urolithiasis. Néphrologie et troubles hydroélectrolytiques. Elsevier Masson SAS.
- Kumar, BS., Kuruba, L., Khan, S., Saran, GS., 2013.** Antiuro lithiatic Activity of Gokhsuradi Churan, an Ayurvedic Formulation By In Vitro Method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2), 477-479
- Kuntz, D., de Vernejoul, M.C., 2000.** Métabolisme phosphocalcique et hypercalciurie idiopathique. *Rev Rhum [Ed Fr]*; 67 Suppl 2 : 79-85
- Kuo RL, Lingeman JE, Evan AP, Paterson RF, Parks JH, Bledsoe SB, et al., 2003.** Urine calcium and volume predict coverage of renal papilla by Randall's plaque. *Kidney Int*; 64: 2150-2154.
- Lagnika, L., 2005.** Étude phytochimique et activités biologiques de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat, Strasbourg et Abomey- Calavi. 168p.
- Lakhdar-Toumi, S., Bereksi-Reguig, K., 2015.** Étude in vivo des effets anti-lithiasiques et diurétiques de la décoction de deux céréales : *Hordeum vulgare* et *Avena sativa*. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-015-0995-2.
- Lee, H.J., Jeong, S.J., Park, M.N., Linnes, M., Han, H.J., Kim, J.H., Lieske, J.C and Kim, S.H., 2012.** Gallotannin Suppresses Calcium Oxalate Crystal Binding and Oxalate-Induced Oxidative Stress in Renal Epithelial Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **35**(4) 539–544.
- Letavernier, E., Daudon, M., 2016.** La plaque de Randall: à l'origine des calculs rénaux. *Bull Acad Natle Méd*; 200 : 1129-1140.
- Letavernier, E., Vandermeersch, S., Traxer, O., Tligui, M., Baud, L., Ronco, P., et al., 2015.** Demographics and Characterization of 10,282 Randall Plaque-Related Kidney Stones A New Epidemic? *Medicine*; 94 (10): e566.
- Leusmann, DB., Blaschke, R., Schmandt, W., 1990.** Results of 5 035 stone analyses: a contribution to epidemiology of urinary stone disease. *Scand J UrolNephrol*; 24:205–10.
- Li, MK., Blacklock, NJ., Garside, J., 1985.** Effects of magnesium on calcium oxalate crystallization. *J Urol*, 133: 123-125.

- Lifshitz, DA., Shalhav, AL., Lingeman, JE., Evan, AP., 1999.** Metabolic evaluation of stone disease patients: a practical approach. *J Endourol*; 13:669—78.
- Linnes, MP., Krambeck, AE., Cornell, L., Williams, JC Jr., Korinek, M., Bergstralh, EJ et al., 2013.** Phenotypic characterization of kidney stone formers by endoscopic and histological quantification of intrarenal calcification. *Kidney Int*; 84:818-25.
- Ljunghall, S., Lithell, H., Skarfors, E., 1987.** Prevalence of renal stones in 60-year-old men. A 10-year follow-up study of a health survey. *Br J Urol*; 60:10—3.
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., Manian, S., 2013.** Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *J Food Sci Technol*; 50 (4):687– 695.
- Low, RK., Stoller, ML., 1997.** Endoscopic mapping of renal papillae for Randall's plaques in patients with urinary stone disease. *J Urol*; 158:2062-4.
- Maalouf, NM., Sakhaee, K., Parks, JH., Coe, FL., Adams-Huet, B., Pak, CY., 2004.** Association of urinary pH with body weight in nephrolithiasis. *Kidney Int* 2004; **65**:1422–5.
- Maisarah AM, Nurul Amira B, Asmah R, Fauziah O, 2013.** Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*. *Int Food Res J*; 20 (3):1043-1048.
- Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., 2007.** Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98, 2963-2967.
- Malhotra, VK., 1998.** *Biochemistry for Students*. Tenth Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi, India.
- Marangella, M., Bagnis, C., Bruno, M., 2004.** Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis. *Urol Int* 72:6–10
- Marco, G.J., 1968.** A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 594–598.
- Marshall, L., Stoller, Maxwell, V., Meng., 2007.** *Urinary stone disease; the practical guide to medical and surgical management*. Current clinical urology. RC916.U74. Humana Press Inc.
- Matlaga, BR., Williams, JC Jr., Kim, SC., Kuo, RL., Evan, AP., Bledsoe, SB et al., 2006.** Endoscopic evidence of calculus attachment to Randall's plaque. *J Urol*; 175:1720-4.
- Mayer, A., Rodríguez, AD., Taglialatela-Scafati, O., Fusetani, N., 2017.** Marine pharmacology in 2012-2013: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs* ; 15(9): 273.

- Meiouet, F., El Kabbaj, S., Daudon, M., 2011.** Étude in vitro d l'activité litholytique de quatre plantes médicinales vis-à vis des calculs urinaires de cystine. *Prog Urol*; 21 : 40—47 .
- Mittal, A., Tandon, S., Singla, SK., Tandon, C., 2015.** In vitro studies reveal antiurolithic effect of *Terminalia arjuna* using quantitative morphological information from computerized microscopy. *Int Braz J Urol.* 41 (5):935–944.
- Mizushima, Y and Kobayashi, M., 1968.** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with same biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20 (1)169-173.
- Monet, C., Richard, E., Missonnier, S., Rebouissoux, L., Llanas, B., Harambat, J., 2013.** Hyperoxalurie et néphrocalcinose secondaires à une intoxication à l'éthylène glycol. *Archives de Pédiatrie*; 20:863-866.
- Moulin, B et Peraldi, M.N., 2016.** Lithiase urinaire. Chapitre 22 Item 262. Collège Universitaire des Enseignants de Néphrologie. 7ème édition.
- Muji, A., Moll, S., Saudan, P., 2015.** La néphropathie aiguë à oxalates : une cause d'insuffisance rénale aiguë à rechercher. *Rev Med Suisse* 2015; volume 11. 493-498
- Mundy, G.R., Martin, T.J., 1993.** Physiology and pharmacology of bone (Handbook of experimental pharmacology vol 107). Berlin. Springer-verlag. 762 pages.
- Naghii, M.R., Eskandari, E., Mofid, M., Jafari, M., Asadi, M.H., 2014.** Antioxidant therapy prevents ethylene glycol-induced renal calcium oxalate crystal deposition in Wistar rats. *Int Urol Nephrol*, 46:1231–1238.
- Neuzillet, Y., Lechevallier, E., Ballanger, P., Ferriere, JM., Saussine, C., Doré, B., et al., 2004.** Lithiase urinaire chez le sujet âgé de plus de 60 ans. *Prog Urol*;14:479—84.
- Nindiyasari, F., Fernández-Díaz, L., Griesshaber, E., Astilleros, J. M., Sánchez-Pastor, N., and Schmahl, W.W., 2014.** “Influence of Gelatin Hydrogel Porosity on the Crystallization of CaCO₃,” *Cryst.Growth Des.*, 14, 4, 1531–1542.
- Nothias, J-L., Traxer, O., 2011.** Comment peut-on éviter la récurrence des calculs urinaires ?. Par Jean-Luc Nothias Mis à jour le 16/10/2011 à 19:02 Publié le 05/06/2011 à 15:27. La réponse de Olivier Traxer, responsable du comité lithiase de l'Association française d'urologie (Hôpital Tenon Paris XXe - Université Pierre et Marie Curie Paris-VI).
- Ohman, S., Larsson, L., 1992.** Evidence for Randall's plaques to be the origin of primary renal stones. *Med hypotheses*; 39: 360-363.
- Okmu, D.E., 2005.** Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int J Mol Adv Sci*; 1(14):375-381.
- Osther, P.J.S., 2012. Epidemiology of Kidney Stones in the European Union.** Dans: Jamsheer, J., Talati, Hans-Goran Tiselius, David, M., Albala, Zhangqun, YE., 2012. *Urolithiasis: Basic Science and Clinical Practice.* Springer London Heidelberg New York Dordrecht.

- Oussama, A., Kzaiber, F., Hilmi, H., Mernari, B., Semmoud, A., Daudon, M., 2000.** Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans le moyen Atlas marocain par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. *Prog Urol*;10:404—10.
- Oussama, A., Kzaiber, F., Mernari, B., Hilmi, A., Semmoud, A., Daudon, M., 2000.** Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans le Moyen Atlas marocain par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. *Progrès en Urologie*, 10, 404-410.
- Ozyigit, I.I., Yalcin, B., Turan, S., Saracoglu, I.A., Karadeniz, S., Yalcin, I.E., Demir, G., 2018.** Investigation of Heavy Metal Level and Mineral Nutrient Status in Widely Used Medicinal Plants' Leaves in Turkey: Insights into Health Implications. *Biol Trace Elem Res* ; 182:387–406
- Pak, CY., Sakhaee, K., Moe, O., Preminger, GM., Poindexter, JR., Peterson, RD., et al., 2003.** Biochemical profile of stone-forming patients with diabetes mellitus. *Urology*; 61:523–7.
- Pak, C.Y.C., Britton, F., Petterson, R., Ward, D., Northart, C., Breslau, N.A., et al., 1980.** Ambulatory evaluation of nephrolithiasis. *Am J Med*; 69 : 19-30.
- Pearson, G., 1798.** Experiments and observations tending to show the composition and properties of urinary concretions. *Philos Trans*; 3:15–46.
- Peccenini, S., 1997.** Données sur la distribution et l'écologie de *Leuzea conifera* (Compositae) en Italie nord-occidentale.
- Prezioso, D., Illiano, E., Piccinocchi, G., Cricelli, C., Piccinocchi, R., Saita, A., et al., 2014.** Urolithiasis in Italy: an epidemiological study. *Arch Ital Urol Androl*. 86:99–102.
- Randall, A., 1936.** An hypothesis for the origin of renal calculus. *N Engl J Med*; 214: 234-237.
- Randall, A., 1940.** Papillary pathology as a precursor of primary renal calculus. *J Urol*; 44: 580.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2(4):152–9.
- Richet, G., 1995.** The chemistry of urinary stones around 1800: a first in clinical chemistry. *Kidney Int*; 48:876–86.
- Rosenow, EC. Jr., 1940.** Renal calculi: study of papillary calcification. *J Urol*; 44:19–28
- Rouzière, S., Bazin, D., Daudon, M., 2009.** La brushite cache-t-elle plusieurs entités pathologiques ? 14èmes Confrontations clinico-biologiques de l'hôpital Necker sur la lithiase urinaire. 22-23.
- Ryall, RL., Chauvet, MC., Grover, PK., 2005.** Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. *BJU Int*; 96:654—63.

- Sahreen, S., Khan, M R., Khan, R A., 2010.** Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122, 1205-1211.
- Sakly, R., et Achour, A., 1994.** Approche diététique de la lithiase rénale. *Ann Urol.* 25 : 237–41.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B. et al., 2007.** "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation." *Ann. Ist. Super. Sanita*, 43: 394-405.
- Saso, L., Valentini, G., Leone, MG., Grippa, E., Silvestrini, B., 1998.** Development of an *in vitro* assay for the screening of substances capable of dissolving calcium oxalate crystals. *Urol Int*;61:210—4.
- Scales Jr, CD., Curtis, LH., Norris, RD., Springhart, P., Sur, RL., Schulman, KA., et al., 2007.** Changing gender prevalence of stone disease. *JUrol*;177:979—82.
- Schroder, FH., 1995.** Association of calcium oxalate monohydrate crystals with MDCK cells. *Kidney Int.* 48:129–138.
- Sekkoum, K., 2011.** Composition phytochimique et effet, *in vitro*, des extraits de quelques plantes médicinales du Sud-Ouest Algérien sur la cristallisation lithiasique oxalocalcique. Thèse de doctorat .Université Djillaliliabes, Faculté des sciences Sidi Belabes.
- Selvam, R., 2002.** Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urol Res* 30: 35–47.
- Shang Y-F, Xu M, Zhang G-N, Ouyang J-M., 2013.** Concave urinary crystallines: direct evidence of calcium oxalate crystals dissolution by citrate *in vivo*. *Bioinorg Chem Appl.* 637617.
- Siener, R., Hesse, A., 2003.** Fluid intake and epidemiology of urolithiasis. *Eur J Clin Nutr*; 57(suppl2):S47–51.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
- Sokhal, S., 2015.** Prévalence et évaluation des facteurs de risque de l’hypovitaminose D chez les adolescents scolarisés dans la Daria de sidi M’Hamed, Thèse de Doctorat en Sciences médicales.
- Soulama, S., et al., 2005.** Teneurs en coumarines de 15 ligneux fourragers du Burkina Faso ; *International Journal of Biological and Chemical Sciences.*
- Stamatelou, KK., Francis, ME., Jones, CA., Nyberg Jr, LM., Curhan, GC., 2003.** Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976—1994. *Kidney Int*; 63:1817—23.
- Straub, M., Strohmaier, WL., Berg, W et al., 2005.** Diagnosis and metaphylaxis of stone disease. Consensus concept of the National Working Committee on Stone Disease for the upcoming German urolithiasis guideline. *World J Urol*, 23: 309-323.

- Sumitra, K., Pragasam, V., Sakthivel, R., et al., 2005.** Beneficial effect of vitamin E supplementation on the biochemical and kinetic properties of Tamm-Horsfall glycoprotein in hypertensive and hyperoxaluric patients. *Nephrol Dial Transpl* 20:1407–1415.
- Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M., 2007.** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem*, 102:938-953.
- Susiki, Y., Landowski, C.P., Hediger, M.A., 2008.** Mechanisms and regulation of epithelial Ca²⁺ absorption in health and disease. *Annu Rev Physiol*;70:257–71.
- Tasca, A., Carbonare, L.D., Nigro, F., Giannini, S., 2009.** Bone disease in patients with primary hypercalciuria and calcium nephrolithiasis. *Urology*; 74:22–7.
- Tazzoli, V., and Domeneghetti, C., 1980.** “The Crystal Structures of Whewellite and Weddellite: Reexamination and Comparison,” *Am. Mineral.*, 65, 327–334.
- Tiselius HG, Ackermann D, Alken P, et al., 2001.** Working Party on Lithiasis, European Association of Urology. Guidelines on Urolithiasis. *Eur Urol*; 40(4):362-71.
- Tiselius, HG., 2010.** New horizons in the management of patients with cystinuria. *Curr Opin Urol*, 20:169-173.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A., 2007.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103, 816–822.
- Traxer O, Lechevallier E, Saussine C., 2008.** Bilan métabolique d'un patient lithiasique. Le rôle de l'urologue. *Prog Urol*, 18, 12, 849-856
- Traxer, O., 2007.** Lithiase urinaire. Service d'urologie, hôpital Tenon, 75020 Paris. *La revue du praticien*. Vol. 57.
- Traxer, O., 2011.** Comment peut-on éviter la récurrence des calculs urinaires ?. Par Jean-Luc Nothias. Publié le 05/06/2011.
- Traxer, O., 2012.** Lithiase urinaire : bilan métabolique et prévention. *Progrès en urologie*, 22, 876—880
- Traxer, O., Lechevallier, E., Saussine, C., 2008.** Lithiase cystinique : diagnostic et prise en charge thérapeutique. *Progrès en urologie*, 18, 832—836
- Traxer, O., Pearle, MS., Gattegno, B., Thibault, P., 2003.** Vitamine C et risque lithiasique. *Progrès en Urologie*, 13, 1290-1294.
- Trinchieri, A., 2008.** Epidemiology of urolithiasis: an update. *Clin Cases Miner Bone Metab.* May-Aug; 5(2): 101–106.
- Trinchieri, A., Coppi, F., Montanari, E., Del Nero, A., Zanetti, G., Pisani, E., 2000.** Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. *EurUrol*; 37:23—5.
- US Preventive Services Task Force, Grossman, DC., Curry, SJ., Owens, DK., Barry, MJ., Caughey, AB et al., 2018.** Vitamin D, Calcium, or Combined Supplementation for

- the Primary Prevention of Fractures in Community-Dwelling Adults: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 319: 1592-1599.
- Vahlensieck, EW., Bach, D., Hesse, A., 1982.** Incidence, Prevalence and mortality of urolithiasis in the German Federal Republic. *Urol Res*; 10:161—4.
- Valeri, A., Joulin, V., Fournier, G., 1999.** Lithiases prostatiques. *Encycl Medchir: Elevier, Nephrologie Urologie*;18-530-A-10:4.
- Wesson, JA., Worcester, EM., Wiessner, JH., Mandel, NS., Kleinman, JG., 1998.**Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules.*Kidney Int*; 53: 952-7.
- Williams, E.L., Bockenbauer, D., van't Hoff W.G, Johri, N., Laing, C., Sinha, M.D., et al., 2012.** The enzyme 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase is deficient in primary hyperoxaluria type 3. *Nephrol Dial Transplant*;27: 3191–5.
- Winkens, RA., Wienders, JP., Degenaar, CP., van Hoof, JP., 1988.** Calcium oxalate crystalluria, a curiosity or a diagnostical aid ? *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 ; 26 : 653-4.
- Wollaston, WH., 1797.** On gouty and urinary concretions.*Philos Trans*; 2:386–400.
- Xia, E Q., Deng, G F., Guo, Y J., Li, H B., 2010.** Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622-646.
- Yoshida, O., Okada, Y., 1990.** Epidemiology of urolithiasis in Japan: achronological and geographical study. *Urol Int*;45:104—11.
- Zilberman, DE., Preminger, GM., 2009.** Long-term results of percutaneous nephrolithotomy: does prophylactic medical stone management make a difference? *J Endourol*, 23: 1773-1776.

Annexes

ANNEXE 1

FACULTE DE MEDECINE D'ANNABA
LABORATOIRE BIOPHYSIQUE

.....le.....

Fiche technique
Renseignements généraux
Patient lithiasique

PATIENT

Nom Prénom :.....
Date et lieu de naissance :.....
Lieu de résidence :.....
Taille :.....
Poids :.....
N° d'enregistrement :.....

PRELEVEMENT/CALCUL(S)

Effectuer le :.....Médecin prescripteur :.....
Localisation :.....
Mode d'élimination :.....
Nombre d'éléments :.....

ANTECEDENTS

.....
.....
.....

Si possible aussi :

ECBU

Biochimie des urines de 24 h

Volume des urines de 24 h

ANNEXE 2

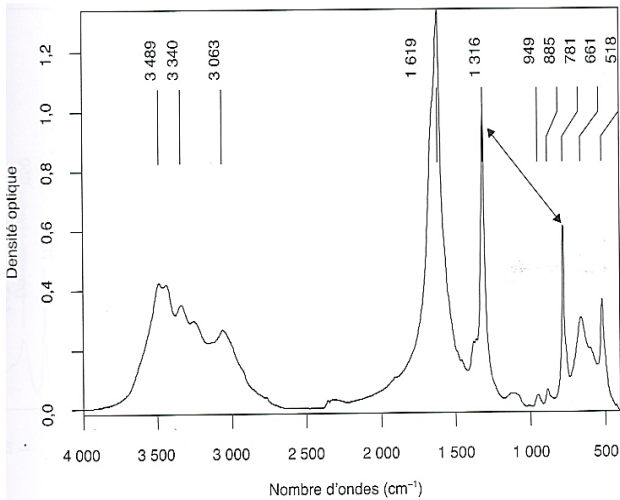


Figure 1 Oxalate de calcium monohydraté (whewellite).

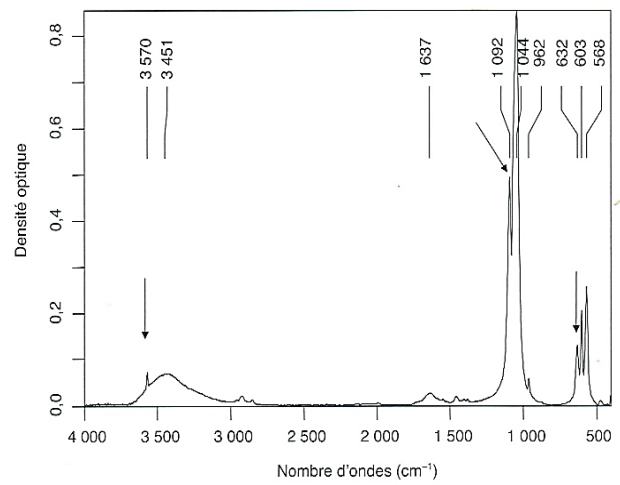


Figure 4 Hydroxyapatite.

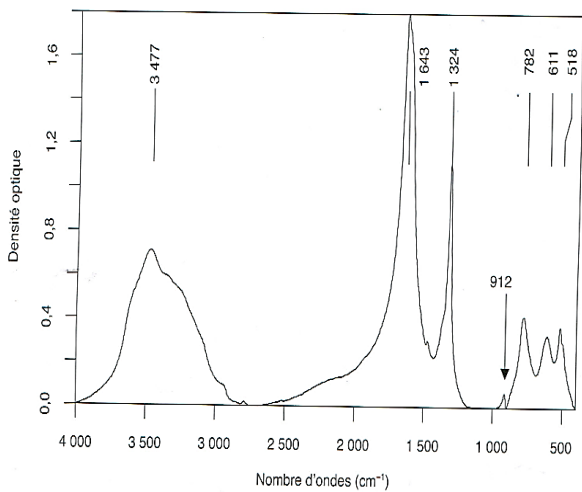


Figure 2 Oxalate de calcium dihydraté (weddellite).

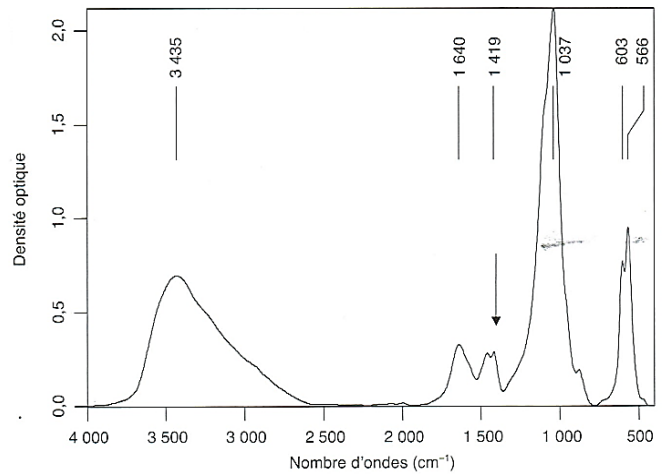


Figure 5 Carapatite.

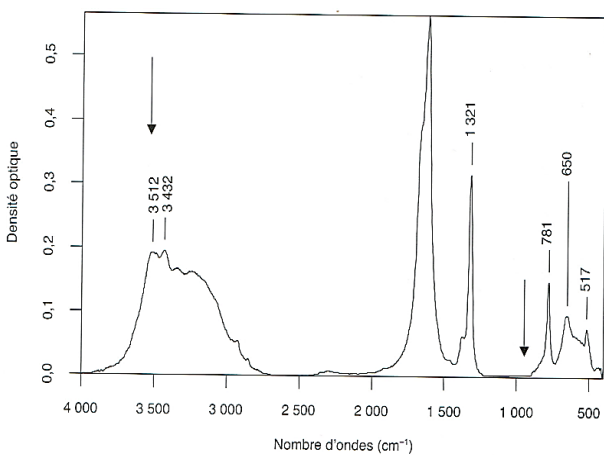


Figure 3 Oxalate de calcium trihydraté (caoxite).

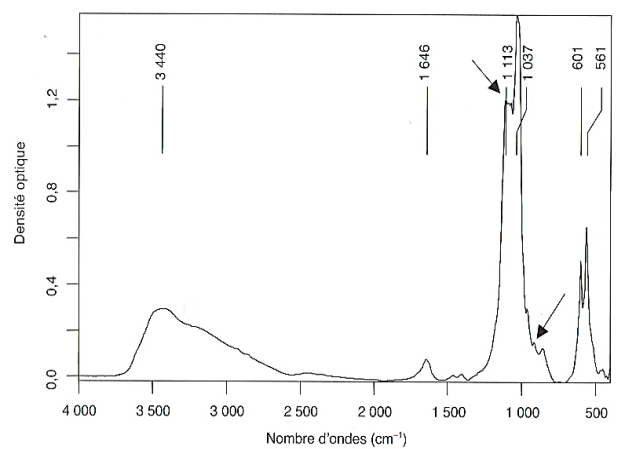


Figure 6 Phosphate octocalcique pentahydraté.

ANNEXE 3

**COMPTE RENDU D'ANALYSE MORPHOLOGIQUE
ET INFRAROUGE DE CALCUL URINAIRE**

PATIENT

Nom Prénom :

N° Service :

Date et lieu de Naissance :

Lieu de résidence :

N° d'enregistrement labo physique :

PRELEVEMENT

Date d'élimination du calcul :

Médecin prescripteur :

Date de réception :



Localisation du calcul :

Mode d'élimination :

Nombre d'éléments :

Dimensions (en mm) :

ASPECT GLOBAL**CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES****Forme****Surface :****Couleur****Section :****Dureté****Noyau :**

TYPAGE MORPHOLOGIQUE		SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE
Surface		
Section		
Noyau		
COMPOSITION DE LA POUDRE GLOBALE		

CONCLUSION**CAUSES HABITUELLES**

Fait à Annaba le : Jour/Mois/Année

ANNEXE 4

➤ Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols

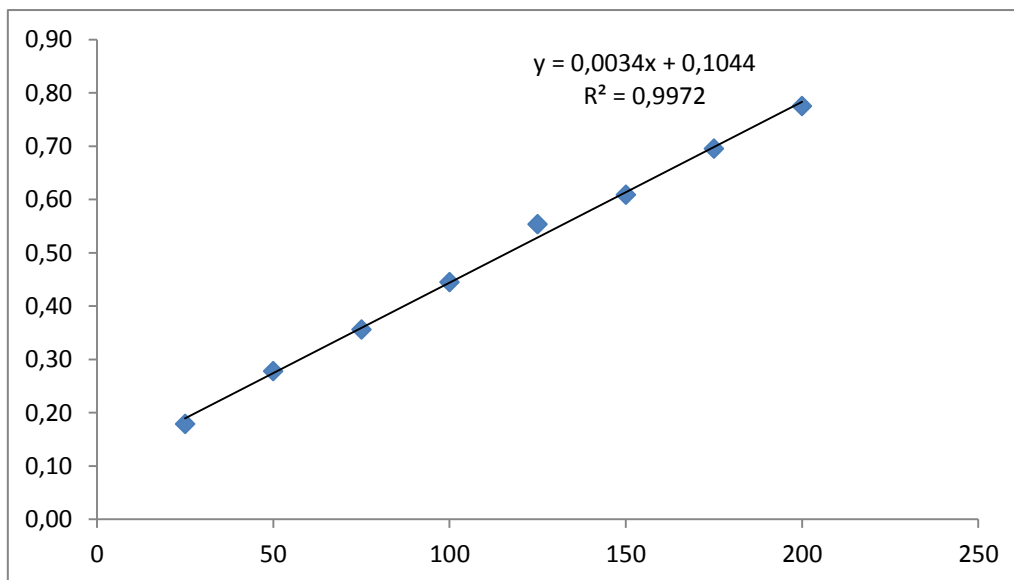


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (25 à 200 µg/ml)

➤ Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

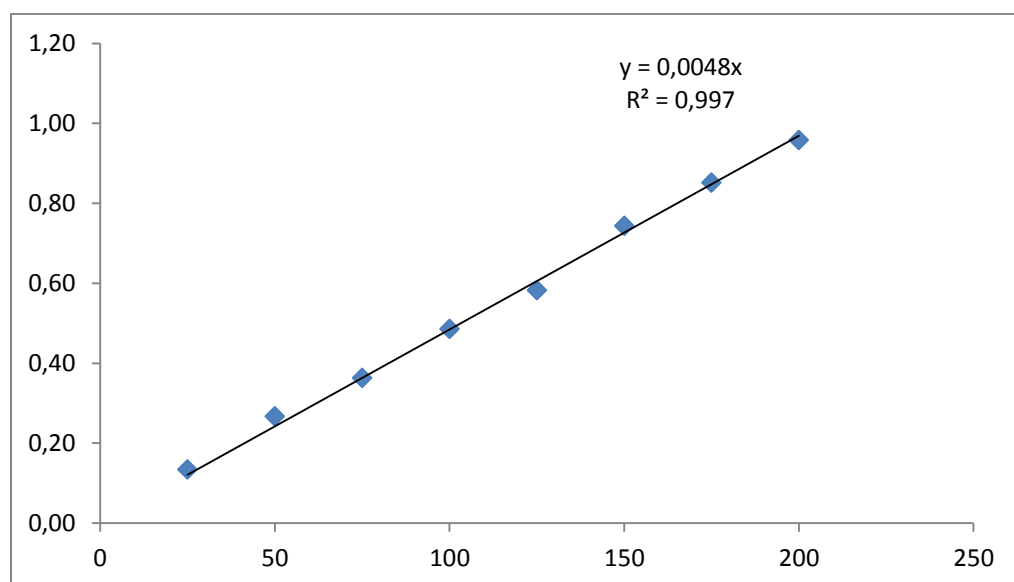


Figure 2: Courbe d'étalonnage de la quercétine (25 à 200 µg/ml)

Liste des publications et
des communications

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications orales

- **LEKOUAGHET Asma**, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, DAUDON Michel. Lithiase de l'arbre urinaire : [Etude de la cristallurie et mesures préventives](#). 9^{ème} Journée national de pharmacie, 9 Juin 2011. Université Hadj Lakhdar Batna
- BOUTEFNOUCHET Abdelatif, BOUSLAMA S, HANNACHE B, **LEKOUAGHET A**, DAUDON M. [Lithiase urinaire dans la région « Est algérien » : analyse des calculs de l'enfant et de l'adulte](#). 18èmes Confrontations Clinico-Biologiques de l'Hôpital Necker sur la Lithiase Urinaire. Hôpital Necker Paris, France. 24 et 25 octobre 2013
- BOUTEFNOUCHET Abdelatif, **LEKOUAGHET A**, GHENAIET K, MECHERI R. [Lithiase de l'enfant et de l'adolescent dans la région Est Algérie](#). 20èmes Confrontations Clinico-Biologiques sur la lithiase urinaire et 1^{er} Atelier sur les troubles hydro- Electrolytiques. Hôpital Tenon Paris (France). 2015
- BOUTEFNOUCHET Abdelatif, **LEKOUAGHET A**, GHENAIET K, MECHERI R, DAHDOUH A. [La Lithiase urinaire initiée sur « plaque de Randall » au niveau de la région Est Algérien : Approche épidémiologique](#). 22èmes confrontations clinico-biologiques sur la lithiase urinaire et 3^{ème} atelier sur les troubles hydro-électrolytiques. Hôpital Tenon, Paris (France) , 2017.

Communications par affiche

- **LEKOUAGHET Asma**, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, BOUSLAMA Slim, CHETIBI K, MANAA M, BOUGOUFA A. [Lithiase de l'enfant et de l'adolescent de la région est-algérien](#). Les Journées Urologiques Nationales d'Annaba. 20 et 21 Juin 2014. Faculté de médecine d'Annaba.

Liste des communications

- **LEKOUAGHET Asma**, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, MECHERI Rym, GHENAIET Khaoula, CHETIBI K, KHAROUBI Latifa. [Lithiase de l'enfant et de l'adolescent](#). Les Journées Urologiques Nationales d'Annaba. 12 et 13 Juin 2015. Faculté de médecine d'Annaba.
- **LEKOUAGHET Asma**, GHENAIET Khaoula, MECHERI Rym, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, CHETIBI K. [Profil épidémiologique de la lithiase de l'arbre urinaire au niveau de la région Est-Algérien : Etude réalisée sur 953 cas](#). Les Journées Urologiques Nationales d'Annaba. 13 et 14 Mai 2016. Faculté de médecine d'Annaba.
- **LEKOUAGHET Asma**, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, GHENAIET Khaoula, MECHE Rym, DAHDOUH A. [Etude de cas clinique d'hyperoxalurie primaire](#). XVIIIème Congrès de la SACU et VIIème Congrès de la SALUDPP. 13 et 14 Avril 2018. Alger.
- **LEKOUAGHET Asma**, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, GHENAIET Khaoula, MECHERI Rym. [Effet in vitro de l'extrait aqueux des racines de *Leuzea conifera* L sur la dissolution des calculs urinaires de cystine](#). 19ème Congrès de la SACU et 8ème Congrès de la SALUDPP. 25 et 26 Avril 2019. Annaba.
- BOUTEFNOUCHET Abdelatif, KHARROUBI L, **LEKOUAGHET A**, GHENAIET K, MECHERI R. [Analyse des calculs urinaires par diffraction X et spectrophotométrie infrarouge](#). XXIII Congrès générale de la SFP. Strasbourg France, 2015.
- BOUTEFNOUCHET Abdelatif, GHENAIET K, **LEKOUAGHET A**, MECHE R. [Détermination des composants lithiasiques associés aux calculs urinaires d'origine infectieuse par spectrophotométrie infrarouge et diffraction des rayons X](#). Journées de la Matière Condensée (JMC15). Bordeaux 2016.



In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract and its fractions from *Leuzea conifera* L. roots

Asma Lekouaghet^{a,b,*}, Abdelatif Boutefnouchet^{c,d}, Chawki Bensuici^e, Lynda Gali^e, Khaoula Ghenaieb^b, Lazhari Tichati^b

^a Institute of Agronomic and Veterinary Sciences, Souk-Ahras, 41000, Algeria

^b Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Annaba University, 23000, Algeria

^c Laboratory of Biophysics, Faculty of Medicine, Annaba, 23000, Algeria

^d Research Unit Materials Science and Applications, Constantine University, 25000, Algeria

^e Research Centre for Biotechnology, P.B E73/UV No. 03 Ali Mendjeli New Town, Constantine, 25000, Algeria

ARTICLE INFO

Article History:

Received 10 October 2019

Revised 29 February 2020

Accepted 31 March 2020

Available online xxx

Edited by S Van Vuuren

Keywords:

Leuzea conifera L.

Antioxidant activity

Anti-inflammatory activity

Total phenols

Total flavonoids

ABSTRACT

Context: This is the first study on the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Leuzea conifera* (Asteraceae). **Objective:** The objective of this study is to evaluate in vitro the antioxidant and anti-inflammatory activities and to determine total phenols, total flavonoids content of different organic extracts of *Leuzea conifera* roots. **Material and methods:** The in vitro antioxidant activity of the extracts were examined by three different methods, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), b-carotene and cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC). The in-vitro anti-inflammatory activity of *Leuzea conifera* was determined by protein denaturation method.

Results: In three methods tested to evaluate the antioxidant activity, ethyl acetate fraction displayed the highest antioxidant capacity (IC₅₀ value: 23.26 ± 0.36 µg/mL in DPPH assay, IC₅₀ value: 7.24 ± 0.25 µg/mL in β-Carotene-linoleic acid assay, and A_{0.50} value: 11.25 ± 0.27 µg/mL in CUPRAC). In this extract, the amount of total phenolics and total flavonoids were very high (344.98 ± 0.28 mg gallic acid equivalent/g, 186.94 ± 0.33 mg quercetin equivalent/g respectively). As for anti-inflammatory assay, ethyl acetate fraction has good activity (97.48 ± 0.68).

Conclusion: Organic extracts of *Leuzea conifera* roots showed better anti-oxidant and anti-inflammatory activity, essentially for the ethyl acetate fraction.

© 2020 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

For thousands of years, humans have used various plants in their environment for therapeutic purposes. These plants are considered medicinal and a finished product for consumption as a raw material for obtaining active substances in the manufacture of drugs for the evolution of humanity.

In recent years, scientific research in biology and chemistry has focused on the extraction, identification and quantification of active ingredients to evaluate in vivo and/or in vitro their biological activities. As oxidative stress is at the origin of various pathological conditions, advances in the field of natural antioxidants are accentuated to ultimately exploit them in health, vis-à-vis chronic diseases and in the food industry.

Due to its privileged geographical position, Algeria is characterized by a great florist diversity represented by 3139 species distributed in nearly

150 botanical families among which 653 species are endemic (Kazi Tani et al., 2010). This Algerian flora is full of several species of plants still little or not studied although with real pharmacological properties (Graham et al., 2000; Bnouham et al., 2002; Gonzalez-Tejero et al., 2008). To this end, our interest fell on the study of a medicinal plant, *Leuzea conifera* L, used in the East-Algerian region against urolithiasis.

The so-called "*Rhaponticum coniferum*", the *Leuzea conifera*, is a perennial herbaceous species with 5–60 cm stem, single and slightly ramose; which ends with a beautiful solitary capitola (40–50 mm) shaped pine cone very characteristic, silvery (bracts shiny and membranous). This mostly Mediterranean plant is found in South-West Europe (Portugal, Spain, France, Italy), the Balearic Islands, Corsica, Sardinia, Sicily and North-West Africa (Morocco, Algeria, Tunisia) (Peccenini, 1997) and it grows on rocky soil and limestone.

Up to our knowledge, there are no studies on the photochemistry and biological activities of *Leuzea conifera* currently. So that, we intend to carry out a phytochemical study on the roots of this plant comprising, the determination of phenolic compounds (total polyphenols, total flavonoids) of different organic extracts and then to evaluate their different antioxidant and anti-inflammatory activities.

* Corresponding author at: Institute of Agronomic and Veterinary Sciences, Souk-Ahras, 41000, Algeria.

E-mail address: a.lekouaghet@univ-soukahrass.dz (A. Lekouaghet).

2. Material and methods

2.1. Plant material

The plant material consists of *L. conifera*, roots obtained from the municipality of “Taoura”, province of “Souk-Ahras”, (Eastern Algeria). This plant was purchased from an herbalist in -Taoura-. The work on the drug utilization studies was licensed by A. Chefour, Professor of Botany at the University of Souk-Ahras. The roots were ground to a fine powder, after which they can be used in preparing different extracts.

2.2. Preparation of the extracts

Root powder (136 g) were prepared by maceration in hydro-alcoholic solution (Ethanol / Water: 80: 20: v / v) for 24 h at room temperature and subject to stirring (VELP Scientifica™ AM4 Magnetic Stirring). This operation was repeated twice with renewal solvent over a time period of from 24 to 48 h. At a later stage, the hydroalcoholic extract has been filtered and concentrated in Rotary Evaporator (BUCHI, R215) at a temperature equal to 40 °C in order to obtain the crude dried extract (10.09%). The crude extract was dissolved in distilled water, filtered and subjected to fractionation using different solvents of increasing polarity, starting with dichloromethane, ethyl acetate and then n-butanol. The three organic fractions were concentrated to provide dryness to extracts; dichloromethane fraction (0.13%), ethyl acetate fraction (0.18%) and butanol fraction (3.15%) and they were stored at 4 °C in the dark, in a refrigerator until use.

2.3. Total phenolic content

The total phenolic content of plant extracts was determined spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi., 1965) with some modifications. In a brief description, 100 μ l of 1:10 Folin-Ciocalteu reagent and 75 μ l of sodium carbonate (7.5%) were added to 20 μ l of each extract. After 2 h of incubation in the dark at room temperature, the absorbance at 765 nm was measured by a micro-plate reader (Perkin Elmer, Enspire), against a control. The total polyphenol content was determined as gallic acid equivalents (mg GAE/g extract).

2.4. Total flavonoid content

The total flavonoid content was estimated using the aluminum colorimetric method (Topçu et al., 2007) with some modifications. A volume of 130 μ l of methanol was transferred into a micro-plate (96 wells) containing 50 μ l of each extract and then 10 μ l of potassium acetate (1 M) and 10 μ l of aluminum nitrate at 10% were added. After 40 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured by micro-plate reader (Perkin Elmer, Enspire) at 415 nm. The concentration of total flavonoids was calculated using standard calibration curve for “quercetin” at different concentrations (1.75–40 μ g/ml). The results were expressed as mg of quercetin equivalent per gram (mg/QE/g) of extract.

2.5. Antioxidant activity

2.5.1. DPPH radical trapping test

The effect of *L. conifera* extracts on DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical was assessed according to the method described by Blois (1958). In micro-plate 96-wells, 40 μ l of each extract at different concentrations was placed in the presence of 160 μ l of a DPPH solution prepared in advance by dissolving 6 mg of DPPH in 100 ml of methanol. Butylated hydroxytoluen (BHT) and butylated hydroxyanisol (BHA), prepared in the same conditions, were used as standard antioxidants. The absorbance was measured at 517 nm against a blank (DPPH / methanol) after 30 min of incubation. The results were

then expressed as percent inhibition of DPPH calculated according to the equation-demonstrated below. The ability of *L. conifera* extract to scavenge the DPPH radical was expressed as IC₅₀ value (mg/mL) corresponding to the concentration of 50% inhibition.

$$I(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

With:

I%: The percentage of inhibition

A₀: Absorbance of DPPH solution without extract

A: Absorbance in the presence of extract or standard

2.5.2. Bleaching activity of β -carotene

The antioxidant capacity of *L. conifera* extracts was evaluated by β -carotene–linoleic acid model system (Marco, 1968). 0.5 mg of β -carotene (red) was dissolved in 1 ml of chloroform. This mixture was then transferred to a flask containing a volume of 200 μ l of Tween 40 and 25 μ l of linoleic acid. After evaporation of the chloroform, 50 ml of H₂O₂ were added with vigorous stirring. 160 μ l of the β -carotene/linoleic acid emulsion was added to 40 μ l of each extract or of synthetic antioxidant (BHA and BHT) at different concentrations in the micro-plate. The kinetics of discoloration of the emulsion in the presence or absence of an antioxidant (negative control in which the sample was replaced by 25 μ l of methanol) was measured at 470 nm before and after incubation at 50 °C, at time varies from T₀, 30, 60, and 90 to 120 min. The antioxidant activity of each sample was expressed as a percentage and calculated by the following equation:

$$I(\%) = 1 - \left(\frac{A(t-0) - A(t-120)}{A_0(t-0) - A_0(t-120)} \right) \times 100$$

I(%): percentage of inhibition

A_(t-0), A_(t-120): value of the absorbance of β -carotene content in the presence of the extract measured at t = 0 and 120 min.

A_{0(t-0)}, A_{0(t-120)}: value of the absorbance of β -carotene content in the presence of the negative control measured at t = 0 and 120 min.

2.5.3. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The cupric reducing antioxidant capacity assay was determined by the CUPRAC method that was developed by Apak et al. (2004). On a 96-wells micro-plate, 40 μ l of the dilutions of each extract are distributed, to which, 50 μ l CuCl₂ (10 mM), 50 μ l of neocuprine solution (7.5 mM) and 60 μ l of ammonium acetate buffer solution (1 M, pH = 7) were added. After 1 h of incubation at room temperature in the dark, the absorbance at 450 nm was measured. The reduction capacity of the extracts was compared with BHA and BHT. The results were unveiled as A_{0.5} (μ g/ml) corresponding to the concentration, indicating 0.50 absorbance.

2.6. Anti-inflammatory activity

The in vitro anti-inflammatory activity of the plant extracts was investigated using the Bovine Serum Albumin Protein Denaturation Assay (BSA) according to Kandikattu et al. (2013) with slight modifications. To for 0.5 ml of each extract concentration or standard (voltarene 75 mg), 0.5 ml of BSA solution (0.2%) prepared in Tris Buffered (pH 6.8) was added. The samples were incubated in the oven at 37 °C for 15 min and then immersed in a water bath at 72 °C for 5 min. After cooling the tubes, the turbidity (level of protein precipitation) was measured at 660 nm in a spectrophotometer and the percentage inhibition of denaturation of the proteins was calculated using the following equation:

$$\%I = \frac{[\text{Control} - (\text{sample} - \text{White})]}{\text{Control}} \times 100$$

- sample: 0.5 ml extract + 0.5 ml BSA

- White: 0.5 ml extract + 0.5 ml Tris-phosphate (pH: 6.8)

Table 1Total phenolic and flavonoid contents of the different extract/fractions from the roots of *L. confifera*.

Extract/fraction	Total phenolics (mg GAE/g) ^c	Total Flavonoids (mg QE/g) ^d
Crude extract	155.57 ± 0.26 ^a	56.53 ± 0.37 ^b
Dichloromethane	256.95 ± 0.23 ^a	116.67 ± 0.29 ^b
Ethyl acetate	344.98 ± 0.28 ^a	186.94 ± 0.33 ^b
Butanol	177.33 ± 0.31 ^a	76.6 ± 0.32 ^b

Results are expressed as means ± SEM of three measures.

Tukey test.

^a $P \leq 0.05$ comparison 2 to 2 for total phenolics.^b $P \leq 0.05$ comparison 2 to 2 for total flavonoids.^c mg AGE/g: milligram Gallic acid equivalent/gram of extract.^d mg QE/g: milligram Quercetin equivalent/gram of extract.- Control: 0.5 H₂O + 0.5 ml BSA

The control represents 100% of the denatured proteins; and the results are compared with 75 mg voltarene

2.7. Statistical analysis

All tests were carried out in triplicate and the results were calculated by the mean ± SEM and analyzed by MINITAB 16. Analysis of variance was performed by ANOVA procedures. Significant differences between means were determined by Tukey test. Therefore, P values ≤ 0.05 were regarded as significant.

3. Results

3.1. Total phenolics and flavonoids

Table 1 shows the amount of the secondary metabolites of crude extracts and its fractions of *L. confifera* roots. Total phenol and flavonoid contents were expressed successively in mg EAG/g and mg EQ/g of extract by using calibration curve (Phenol: $y = 0.0034x + 0.1044$, $R^2 = 0.9972$, Flavonoid: $y = 0.0048x$, $R^2 = 0.997$).

Our results show that the plant is rich in polyphenols with a total phenol content for all extracts that varies between 155.57 ± 0.26 and 344.98 ± 0.28 mg EAG/g of extract. Note that the fraction of ethyl acetate (344.98 ± 0.28 mg/EAG/g) contains the highest concentration of polyphenols compared to other fractions. As for the total flavonoids, the ethyl acetate fraction gives the highest content (186.94 ± 0.33 mg/EQ/g) relative to the other extracts, followed by the dichloromethane fraction with a content of 116.67 ± 0.29 mg/EQ/g of extract.

3.2. Antioxidant activity

The results of the antioxidant activity determined using the DPPH, CUPRAC and β -carotene tests are resumed in Table 2. The IC₅₀ value expresses the amount of each extract necessary to inhibit free radicals to 50%. However, It is inversely related to the antioxidant capacity of a compound and accordingly, the lower the IC₅₀ value, the higher the antioxidant activity of a compound.

Table 2Antioxidant activity of different extract/fractions of *L. confifera* roots by DPPH, β -Carotene, and CUPRAC assays^a.

Extract/fraction	DPPH- assay	β -Carotene-linoleic acid assay	CUPRAC assay
	IC ₅₀ μ g/mL	IC ₅₀ μ g/mL	A _{0.5} μ g/mL
Crude extract	144.61 ± 0.74 ^{b,c}	17.07 ± 0.43 ^{b,c}	70.81 ± 0.62 ^{b,c}
Dichloromethane	65.57 ± 0.39 ^{b,c}	12.99 ± 0.22 ^{b,c}	18.98 ± 0.41 ^{b,c}
Ethyl acetate	23.26 ± 0.36	7.24 ± 0.25 ^b	11.25 ± 0.27 ^{b,c}
Butanol	125.23 ± 0.56 ^{b,c}	21.89 ± 0.31 ^{b,c}	40.92 ± 0.52 ^{b,c}
BHT ^{d,e}	22.32 ± 0.36 ^c	1.05 ± 0.03 ^c	9.62 ± 0.31 ^c
BHA ^{d,f}	5.73 ± 0.21 ^b	0.90 ± 0.05 ^b	3.64 ± 0.15 ^b

^a IC₅₀ and A_{0.5} values represent the means ± SEM of three measures. Tukey test.^b $P < 0.05$ compared with BHT.^c $P < 0.05$ compared with BHA.^d Reference compounds.^e Butylated hydroxytoluen.^f Butylated hydroxyanisol.

In fact, it is worth note that the ethyl acetate fraction of *L. confifera* exhibited a higher antioxidant activity in all three tests, than that of the other extracts.

On the other hand, we note that there is a correlation between polyphenol concentration and antioxidant activity, confirming that polyphenols are potent antioxidants capable of inhibiting the formation of free radicals and opposing the oxidation of macromolecules.

3.3. Anti-inflammatory activity

Table 3 shows the results of the in vitro anti-inflammatory activity of the organic extracts of the roots of *L. confifera*.

We note that the percentage inhibition of denaturation of BSA (0.2%) is proportional to the concentration of different plant extracts, where the highest percentage was recorded in the ethyl acetate fraction at the 5000 ppm concentration, with 97.48 ± 0.68 . Nevertheless, These values are close to that obtained for voltarene (75 mg), that is used as a standard; an anti-inflammatory drug, and that is completely prevented the denaturation of BSA at the same concentration.

4. Discussion

Leuzea confifera is a medicinal plant used by the Algerian people as a remedy for urolithiasis. However, as yet no research had been conducted to on this species to determine its biological effects, and therefore, consideration has been given to identify the antioxidant and anti-inflammatory properties in *L. confifera* roots.

The phenolic compounds, in fact, make up a major group of phytochemicals in plants, having a significant pharmacological effect, and playing an important role in neutralizing free radicals, and accordingly, it is interesting to sort out the total levels of these compounds in the used part of the plant.

Several studies show that methanol (or ethanol) and water as well as their different ratios are the most used solvents to extract phenolic

Table 3Effect of *L. confifera* roots extracts on albumin denaturation.

PPM	%Inhibition ^a				
	Crude extract	Dichloromethane	Ethyl acetate	Butanol	Voltarene ^c (75 mg)
5000	47.60 ± 0.39 ^b	79.96 ± 0.65 ^b	97.48 ± 0.68	23.81 ± 0.39 ^b	100 ± 0.18
1500	36.00 ± 0.44 ^b	46.75 ± 0.49 ^b	31.47 ± 0.54 ^b	23.44 ± 0.18 ^b	92 ± 0.15
1250	20.41 ± 0.25 ^b	36.18 ± 0.4 ^b	15.36 ± 0.42 ^b	7.7 ± 0.32 ^b	61 ± 0.15
625	14.14 ± 0.34 ^b	5.98 ± 0.38 ^b	2.75 ± 0.5 ^b	5.03 ± 0.68 ^b	37 ± 0.18

^a Values represent the means±SEM of three measures. Tukey test.^b $P < 0.05$ compared with voltarene.^c Reference compounds.

compounds (Sahreen et al., 2010; Xia et al., 2010; Bouzid et al., 2011). In the study in question, a considerable yield of the hydro-alcoholic extract of *L. conifera* roots was recorded.

Following this extraction, an assay of the total phenols and total flavonoids is carried out according to the method of Folin Ciocalteu and the method of aluminum chloride respectively. This quantitative study revealed variable levels of polyphenols and flavonoids. The outcomes uncover that ethyl acetate and dichloromethane fractions have the highest levels of phenols and flavonoids.

According to Djeridane et al. (2006), this abundance is characteristic of the "Asteraceae" family. This may be attributed in particular to the great influence of extreme climatic conditions (high temperatures, insolation, drought and salinity), which stimulate the biosynthesis of secondary metabolites such as polyphenols (Falleh et al., 2008).

4.1. Antioxidant activity

The oxidative processes are multiple and the nature of the antioxidant activity can be multiform and attributed to different mechanisms either by protecting the target lipids of the initiators of the oxidation, or by interrupting the propagation phase (Leger, 2006). In the first case, the antioxidants prevent the formation or trap the ROS responsible for the initiation of oxidation ($O_2 \cdot^-$, $1 O_2 \dots$). In the second case, the chain-breaking antioxidants intercept the oxidation-propagating radicals (lipoperoxyl radicals, or $LOO \cdot$) or indirectly participate in the interruption of the radical chain oxidation. (Laguerre et al., 2007)

In view of the complexity of oxidation processes and the diverse nature of antioxidants, with both hydrophilic and hydrophobic components, we haven't seen a global approach to quantitatively measure antioxidant activity in a precise manner, but increasingly there is most often a need to combine the outcomes of different and complementary investigations to provide an indication of antioxidant capacity of the test sample (Tabart et al., 2009; Hua et al., 2008a).

The most commonly used method for determining this antioxidant capacity is the DPPH radical. The antioxidant activity of organic root extracts of *L. conifera* and standard antioxidants (BHT and BHA) with regard to the radical DPPH was evaluated according to its reduction, by combining both ; H-atom and electron transfer mechanisms, which is accompanied by its change from violet (DPPH \bullet) to yellow (DPPH-H) measurable at 515 nm. This reduction capacity is determined by a decrease in the absorbance induced by anti-radical substances (Majhenic et al., 2007).

Another antioxidant test carried out is the inhibitory activity of lipid peroxidation by our extracts which has been evaluated by the β -carotene bleaching test. The principle of this test is based on the loss of the yellow color of β -carotene due to its reaction to radicals which consist of oxidation of linoleic acid in an emulsion. The presence of different antioxidants may interfere with the extent of β -carotene bleaching by neutralizing the free radical of linoleate and other free radicals formed in the system (Kadri et al., 2011).

According to the CUPRAC test, it is an analysis based on an electron transfer reaction, monitored by a color change when the oxidant is reduced.

In the present work, the ethyl acetate and dichloromethane fractions demonstrate a strong antioxidant activity. This high activity is obviously correlated with the total phenolic content and total flavonoid content. Several authors (Surveswaran et al., 2007; Makris et al., 2007; Hua et al., 2008b; Angelov et al., 2008; Bozan et al., 2008) have reported that the antioxidant activity depends on the amount of phenolic compounds of plant extracts. Indeed, this valuable antioxidant activity may be associated with the number of hydroxyl groups (Rice-Evans et al., 1997), and their position in the molecule as well as the nature of the phenolic compounds, which can act in synergy (Cirico and Omaye., 2006).

Antioxidant properties of phenolic compounds have been thoroughly described, although in some cases the mechanism of such

activity is not fully understood yet. Some of the biological functions leading to this effect involve phenolic compounds acting as hydrogen donors, free radical acceptors, chain oxidation reaction interrupters or metal chelators (Viuda-Martos et al., 2010).

4.2. Anti-inflammatory activity

In order to evaluate the in-vitro anti-inflammatory effect of organic extracts of the roots of *L. conifera*, we opted for the method of protein denaturation following the increase of the temperature (Kandikattu et al., 2013). The possible mechanism of this denaturation consists of the alteration of the electrostatic, hydrogen, hydrophobic and disulfide bonds which maintain the three-dimensional structure of the proteins (Mizushima et al., 1968; Barros et al., 2008). In vivo, this denaturation causes the induction of the inflammatory reaction by the production of self-antigens (Barros et al., 2008; Bagad et al., 2011).

From our results, it is found that the percentage of inhibition of the denaturation of albumin, by the different extracts of the roots of *L. conifera*, is proportional to the concentration. The ethyl acetate fraction at a concentration of 5000 ppm gave a better inhibition of denaturation of BSA by 18% and is close to that of voltarene (7 mg), an anti-inflammatory drug used as a standard, which exerted percentage inhibition 100% at the same concentration.

This beneficial effect may be due to the presence of polyphenols in *L. conifera* root extracts as it has been shown, in various in vivo and in vitro studies, that polyphenols decrease markers of inflammation (Gonzalez-Gallego et al., 2010) and acted on many molecular targets at the center of inflammation signaling pathways (Santangelo et al., 2007).

5. Conclusion

In the present work, *Leuzea conifera* was studied for the first time. The phytochemical analysis of the crude extracts and its fractions showed the presence of the important amount on total phenolic and flavonoids. The effect in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Leuzea conifera* roots extract showed a good antioxidant activity especially the ethyl acetate fraction.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

My thanks to Dr. Chawki BENSOUICI, Head of Laboratory of Biochemistry in Biotechnology Research Center, Constantine, Algeria, who gave us the opportunity to do these experiments in his laboratory and for his confidence and advice throughout this internship. Authors also thank Pr. A. Chefrour (Faculty of Science, Department of Biology, Mohamed cherif Messaadia University) for the identification of the plant sample.

References

- Angelov, G., Boyadzhiev, L., Georgieva, S., 2008. Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *J. Int. Sci. Publ.* 3 (1), 143–150.
- Apak, R., Guclü, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970–7981.
- Bagad, Y.M., Umalkar, A.R., Tatia, A.U., Surana, S.J., 2011. Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *brideliaaairyshawii* (Euphorbiaceae). *J. Pharm. Res.* 4 (5), 1326–1332.
- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R., 2008. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.* 111, 61–66.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 4617 (181), 1119–1200.

- Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyyat, A., 2002. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab* 10, 33–50.
- Bouzid, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M., Ayachi, A., 2011. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de L'Aubepine *Monogynne*. *Leban. Sci. J.* 12 (1), 59–69.
- Bozan, B., Tosun, G., Ozcan, D., 2008. Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxydant activity. *Food Chem.* 209, 426–430.
- Cirico, T.L., Omaye, S.T., 2006. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low-density lipoprotein oxidation. *Food Chem. Toxicol.* 44 (4), 510–516.
- Djeridane, M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouna, P., Stocker, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97, 654–660.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 331, 372–379.
- Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Tunon, M.J., 2010. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br. J. Nutr.* 104, S15–S27.
- Gonzalez-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sanchez-Rojas, C.P., et al., 2008. Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol.* 116, 341–357.
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2000. Plants used against cancer extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol.* 73, 347–377.
- Hua, Li., Xiaoyu, Wang., Peihong, Li., Yong, Li., Hua, Wang., 2008. Comparative Study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *J. Food Drug Anal.* 16 (6), 67–73.
- Hua, Li., Xiaoyu, W., Peihong, Li., Yong, Li., Hua, W., 2008. Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *J. Food Drug Anal.* 16 (6), 67–73.
- Kadri, A., Zarai, A., Békir, A., et al., 2011. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 3908–3914.
- Kandikattu, K., Bharath Rathna Kumar, P., Venu Priya, R., Sunil Kumar, K., Ranjith Singh, B., Rathore, 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.* 1 (5), 729–730.
- Kazi Tani, Ch., Le Bourgeois, T., Munoz, F., 2010. Aspects floristiques des adventices du domaine phytogéographique oranais (Nord-Ouest algérien) et persistance d'espèces rares et endémiques. *Flora Medit.* 20, 29–46 2010. — ISSN 1120-4052.
- Laguette, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P., 2007. Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Fondamental OCL* 14 (5) Septembre–Octobre.
- Leger, C., 2006. Antioxydants d'origine alimentaire: diversité, modes d'action antioxydante, interactions. *Ol Corps Gras Lipides* 13, 59–69.
- Majhenic, L., Kerget, M.S., et Knez, Z., 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem* 104, 1258–1268.
- Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., 2007. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bio-resour. Technol.* 98, 2963–2967.
- Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 594–598.
- Mizushima, Y., Kobayashi, M., 1968. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with same biologically active proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 20 (1), 169–173.
- Peccenini, S., 1997. Data on the distribution and ecology of *Leuzea conifera* (Compositae) in N.W. Italy [in French]. - *Bocconea* 5, 691–702 -ISSN 1120-4060.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2 (4), 152–159.
- Sahreen, S., Khan, M., Khan, R.A., 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem.* 122, 1205–1211.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., et al., 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanita* 43, 394–405.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 102, 938–953.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., Dommes, J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113, 1226–1233.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sankürkü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A., 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem.* 103, 816–822.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y., Li, H.B., 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 622–646.
- Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sanchez Zapata, E., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J.A., 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J.* 25 (1), 13–19.