

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  
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THEME

**Infection urinaire et lithogénèse**

**Étude réalisée au niveau de la région «Est algérien»**

**Impact épidémiologique et mesures prophylactiques**

Présentée par : M<sup>me</sup> GHENAIET Khaoula

Directeur de thèse : Mr BOUTEFNOUCHET Abdelatif Prof., Université Badji Mokhtar d'Annaba

Co-Directrice de thèse : Mme CHETTIBI Houria Prof., Université Badji Mokhtar d'Annaba

Membres de Jury:

Président : Mr SOUMATI Boudjema Prof., Université Badji Mokhtar d'Annaba

Examinatrice : Mme BENHADJ Mabrouka MCA, Universit Chahid Larbi Tébessi-Tébessa

Examinatrice : Mlle BOURAFA Nadjette MCA, Université Mohamed-Chérif

Examinatrice : Mme RAMOUL Abir Messaadia-Souk Ahras  
MCA, Université Badji Mokhtar d'Annaba

Année universitaire : 2022/2023

## ***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 ***BOUTEFNOUCHET Nafissa***, Professeur à l'université d'Annaba, je vous remercie pour l'honneur que vous me faites, en acceptant d'être co-encadreur, pour son aide et son soutien.

Mes vifs remerciements vont également à ***Madame CHETTIBI Houria***, professeur à l'université d'Annaba, Merci Madame d'avoir accepté de Co-encadrer ce travail.

### ***Aux membres du jury***

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

Mes sincères remerciements vont également à Mesdames, ***BENHADJ Mabrouka***, Maître de conférence A à l'université de Tebessa, ***BOURAFI Nadjette***, Maître de conférence A à l'université de Souk Ahras, ***RAMOUL Abir***, Maître de conférence A à l'université d'Annaba, 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 leurs éloignement et leurs nombreuses charges.

### ***Aux responsables des laboratoires de recherche***

Je remercie sincèrement mon maître 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.

### ***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 LEKOUAGHET Asma**, Doctorante en Biochimie, à l'université de Souk Ahras. Merci pour ton soutien et tes encouragements. Merci également pour tous les moments partagés depuis ces nombreuses années. Je te souhaite de bonheur et de réussite.

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

**A MECHERI Rym**, Maître de Conférences à l'université d'Annaba. Merci pour ta ton aide à l'identification de la plante.

### *A mes collègues*

Un grand merci à **BENSACI Narimen**, Doctorante en microbiologie, à l'université d'Annaba, et **TICHATI Lazhari**, Docteur en santé environnementale, pour votre grande aide.

Merci à ma chère **AMALEK Amina**, **MAHMOUDI Khaoula**, **BOUTEFNOUCHET Chahinez**, **Sabrina**, **BOUDIAR Inès**, **AHMED GAID Kelthoum**, **MESSAOUD Atra**, **AYAD Wissam**, **MANSOUR chaima**, 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 mes chers parents : **Abdessalem & Fatima***

*A mon cher époux **Saif Elislam Mohamed** et ma princesse **Taline***

*A mes chères Sœurs : **Soumaya, Nafissa, Asma et Sara***

*A mes frères : **Oussama et Souhaieb.***

*A mes Nièces et mes Neveux : **Iyed, Djoud, Aroua, Miral, Rym et Djoumana***

*A tous les membres de ma famille et ma belle-famille sans aucune exception : **GHENAIET***

***& BRAHAM***

*A tous mes proches, tous mes amis, toute personne m'a réconfortée, à tous ceux qui étaient là, pour me soutenir, m'encourager et m'aimer.*

# **Résumé**

## Résumé

Dans le cadre de la contribution à l'étude de la lithiase urinaire en Algérie, on a établi l'impact de la lithiase infectieuse, au niveau de la région « Est Algérien ». Différents volets ont été envisagés dont le premier consacre à une étude épidémiologique sur un ensemble de 1553 cas lithiasiques afin de déterminer la fréquence des calculs en rapport avec l'infection et d'établir avec le plus de précision les conditions de leur lithogénèse. Les calculs urinaires ont été analysés selon une approche morpho-constitutionnelle qui détermine, pour chaque calcul, aussi bien son typage morphologique que sa composition chimique orientant vers sur les principales étiologies responsables de sa formation. Quant à la composition des calculs, Il ressort de cette analyse une prédominance nette de l'oxalate de calcium. La lithiase d'infection, sujet de notre thème, représente 222 cas (Homme : 121 et Femme : 101).

Dans le deuxième volet de ce travail on a entrepris une expérimentation in-vitro sur la formation des cristaux de struvite à partir de différentes bactéries. Cette étude a montré une forte corrélation entre l'infection urinaire et la formation des cristaux de struvite. Elle a également mis en évidence les cinétiques de germination et croissance par type de bactéries testées.

Au final notre travail a été clôturé par une étude sur une prise en charge préventive de la lithiase d'infection via des mesures prophylactiques à base d'une plante médicinale. L'extrait de plante utilisé est celui des feuilles de *Fraxinus excelsior* L (famille ; Oléacées) dont on a évalué ses effets anti-lithiasique et anti-bactérien. Pour ce faire, on a procédé par une étude quantitative de l'extrait aqueux (E.Aq) au moyen des dosages spectrophotométriques qui permet de déterminer la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes, les résultats enregistrés ont révélé des taux importants qui sont respectivement, de  $60,92 \pm 0,94$  mg EAG/g d'extrait et  $19,32 \pm 0,75$  mg EQ/g d'extrait. Le test de l'effet inhibiteur, in vitro, a montré que de l'E.Aq de *Fraxinus excelsior* a exercé un effet remarquable sur la cristallisation de struvite. Par ailleurs, un effet dissolutif important a été prouvé sur les cristaux de struvite précédemment formés. Finalement, les tests de l'activité antibactérienne vis-à-vis des isolats bactériens de patients lithiasiques sont exprimés sous forme de diamètres de zones d'inhibition par la méthode de diffusion sur disque et de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de microdilution. L'activité antibactérienne s'est révélée importante avec des CMI comprises entre 3,15 à 25 mg/ml et elle est variable selon la nature de l'espèce bactérienne testée.

**Mots clés :** Lithiase, infection urinaire, morpho-constitutionnelle, cristallisation, struvite, *Fraxinus excelsior*, inhibition, activité antibactérienne.

## Abstract

As part of the contribution to the study of urinary lithiasis in Algeria, the impact of infectious lithiasis in the "East Algerian" region was established. Various aspects were considered, the first of which was an epidemiological study of a set of 1553 stones cases in order to determine the frequency of stones in relation to infection and to establish with the greatest precision the conditions of their lithogenesis. The urinary stones were analysed using a morpho-constitutional approach which determines, for each stone, both its morphological typing and its chemical composition, orienting towards the main etiologies responsible for its formation. As for the composition of the stones, this analysis shows a clear predominance of calcium oxalate. Infection lithiasis, the subject of our theme, represents 222 case. (Men: 121 and Women: 101).

In the second part of this work, an in-vitro experiment on struvite crystal formation from different bacteria was undertaken. This study showed a strong correlation between urinary tract infection and struvite crystal formation. It also highlighted the germination and growth kinetics for each type of bacteria tested.

Finally, our work was concluded with a study on the preventive management of lithiasis via prophylactic measures based on a medicinal plant. The plant extract used was that of the leaves of *Fraxinus excelsior* L (family; Oleaceae) whose anti-lithiasis and anti-bacterial effects were evaluated. To do this, a quantitative study of the aqueous extract was carried out by means of spectrophotometric assays to determine the content of total polyphenols and flavonoids. The results recorded revealed significant levels of  $60,92 \pm 0,94$  mg EAG/g of extract and  $19,32 \pm 0,75$  mg EQ/g of extract respectively. The inhibitory effect test, in vitro, showed that aqueous extract of *Fraxinus excelsior* exerted a remarkable effect on struvite crystallization. Moreover, a significant dissolving effect was proven on previously formed struvite crystals. Finally, tests of antibacterial activity against bacterial isolates from lithiasis patients are expressed as inhibition zone diameters by the disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) by the microdilution method. Antibacterial activity was found to be significant with MICs between 3,15 and 25 mg/ml and varied according to the nature of the bacterial species tested.

**Keywords:** Lithiasis, urinary tract infection, morpho-constitutional, crystallization, struvite, *Fraxinus excelsior*, inhibition, antibacterial activity.

## ملخص

كجزء من المساهمة في دراسة حصى البول في الجزائر قمنا بدراسة حول الحصى الناتج عن العدوى على مستوى منطقة "شرق الجزائر". تم النظر في أجزاء مختلفة، أولها خصص لدراسة تحليل حصى الكلى من جملة 1553 حالة حصى المسالك البولية و هذا من أجل تحديد تواتر الحصى المرتبطة بالتهاب المسالك البولية و تحديد شروط تكوينها بأكبر قدر من الدقة. تم تحليل هذه الحصوات وفق منهج شكلي و بنيوي والذي يحدد ، لكل حصى ، نوعه المورفولوجي وتركيبه الكيميائي و بذلك تحديد المسببات الرئيسية المسؤولة عن تكوينه. يُظهر هذا التحليل غالبية واضحة لأوكسالات الكالسيوم. بالنسبة للحصى الناتج عن العدوى، موضوع دراستنا، إتضح أن هذا النوع من التكون الحصىي يؤثر على 222 حالة (ذكور: 121 ، إناث: 101).

في الجزء الثاني من هذا العمل، تم إجراء تجربة في المختبر، على تكوين بلورات ستروفيت بواسطة أنواع مختلفة من البكتيريا. و فيه، أظهرت هذه الدراسة وجود علاقة قوية بين عدوى المسالك البولية وتكوين بلورات الستروفيت. كما سُلط الضوء على حركية تكوُّن ونمو بلورات الستروفيت حسب نوع البكتيريا المختبرة.

من أجل التدبير الوقائي، تم تقييم التأثيرات المثبطة لتشكيل الحصى العدوي و المضادة للبكتيريا لنبات طبي

(عائلة: *Fraxinus excelsior* (Oleaceae).

شرعنا في دراسة التحليل الكمي للمستخلص المائي عن طريق استخدام المقاييس الطيفية لتحديد المحتوى الإجمالي لمتعدد الفينول والفلافونويدات ، حيث كشفت النتائج المسجلة عن معدلات معتبرة وهي على التوالي ،  $0,94 \pm 60,92$  مغ معادل لحمض الغاليك/ غ من المستخلص و  $0,75 \pm 19,32$  مغ معادل الكغستين/غ من المستخلص. كان تأثير المثبط ملحوظ على تبلور و تنامي الستوفيت. من ناحية أخرى ، تم إثبات تأثير ذوباني كبير للمستخلص المائي للنبات الطبي المختبر، على بلورات الستروفيت المشكلة مسبقاً.

أخيراً ، تم التعبير عن نتائج إختبارات قدرة النشاط المضاد للبكتيريا ضد السلالات البكتيرية المعزولة من بول مرضى الحصى الكلوي بطريقة الإنتشار القرصي و حساب تركيز المثبط الأدنى من خلال طريقة التخفيف المتسلسل. و فيه أثبتت أن النشاط المضاد للبكتيريا كان معتبرا حيث قدر ما بين 3,15 و 25 ملغ/مل و متغير تبعا لطبيعة البكتيرية التي تم اختبارها.

**الكلمات المفتاحية :** عدوى المسالك البولية ، الشكلي التركيبي ، التبلور ، الستروفيت ، تثبيط، النشاط المضاد للبكتيريا،

*Fraxinus excelsior*.

## TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale..... 1

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Infection et la lithiase urinaire

<b>I.1. Rappel anatomique et physiologique du tractus urinaire.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1.1. Système urinaire.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1.2. Constitution de l'appareil urinaire.....</b>	<b>4</b>
<b>I.2. Infection urinaire.....</b>	<b>5</b>
<b>I.2.1. Définitions.....</b>	<b>5</b>
<b>I.2.2. Classification.....</b>	<b>5</b>
<i>I.2.2.1. Les infections urinaires non compliquées.....</i>	<i>5</i>
<i>I.2.2.2. Les infections urinaires compliquées.....</i>	<i>6</i>
<b>I.3. Définition de la lithiase urinaire.....</b>	<b>6</b>
<b>I.4. Historique de la lithiase urinaire.....</b>	<b>6</b>
<b>I.5. Prévalence et incidence de la lithiase de l'arbre urinaire.....</b>	<b>7</b>
<b>I.6. Lithogénèse.....</b>	<b>9</b>
<b>I.7. Etapes de la lithogénèse.....</b>	<b>10</b>
<i>I.7.1. Sursaturation des urines.....</i>	<i>10</i>
<i>I.7.2. Germination ou nucléation cristalline.....</i>	<i>11</i>
<i>I.7.2.1. La nucléation homogène.....</i>	<i>11</i>
<i>I.7.2.2. La nucléation hétérogène.....</i>	<i>12</i>
<i>I.7.3. Croissance cristalline.....</i>	<i>12</i>
<i>I.7.4. Agrégation des cristaux.....</i>	<i>13</i>
<i>I.7.5. Agglomération cristalline.....</i>	<i>13</i>
<i>I.7.6. Rétention des particules cristalline.....</i>	<i>13</i>
<i>I.7.7. Croissance et évolution du calcul.....</i>	<i>13</i>
<b>I.8. Promoteurs et inhibiteurs de la lithogénèse.....</b>	<b>14</b>
<i>I.8.1. Promoteurs de la formation de calculs.....</i>	<i>15</i>
<i>I.8.2. Inhibiteurs de la formation de calculs.....</i>	<i>15</i>
<b>I.9. Facteurs de risque de la lithiase urinaire.....</b>	<b>17</b>
<b>I.10. Classification morpho-constitutionnelle et orientations étiologiques.....</b>	<b>18</b>
<b>II. Lithiase d'infection.....</b>	<b>26</b>

<b>II.1. Définition de la lithiase d'infection</b> .....	<b>28</b>
<b>II.2. Mécanisme de la lithogénèse infectieuse</b> .....	<b>28</b>
<b>II.3. Calcul infecté et calcul d'infection</b> .....	<b>29</b>
<b>II.4. Microorganisme uréolytiques</b> .....	<b>30</b>
<b>II.5. Les cristaux de la lithiase d'infection</b> .....	<b>32</b>
<b>II.6. Traitement de lithiase d'infection</b> .....	<b>32</b>
<b>II.7. la phytothérapie et lithiase urinaire</b> .....	<b>35</b>
<b>II.7.1. Description botanique de l'espèce végétale étudié « <i>Fraxinus excelsior</i> »</b> .....	<b>36</b>
<b>II.7.2. Répartition géographique</b> .....	<b>36</b>
<b>II.7.3. Composition chimique et activités biologiques</b> .....	<b>37</b>

## PARTIE PRATIQUE

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

<b>I.1.Introduction</b> .....	<b>38</b>
<b>I.2.Matériel et méthodes</b> .....	<b>38</b>
<i>I.2.1. Lithiase de l'arbre urinaire</i> .....	<b>38</b>
<i>I.2.2. Analyse des calculs</i> .....	<b>39</b>
<i>I.2.2.1. Examen morphologique</i> .....	<b>39</b>
<i>I.2.2.2. Analyse Infrarouge</i> .....	<b>41</b>
<i>I.2.2.3. Analyses Statistiques</i> .....	<b>42</b>
<b>I.3. Examen morphologique</b> .....	<b>42</b>
<i>I.3.1. Observations à la loupe binoculaire</i> .....	<b>45</b>
<i>I.3.2. Observations au Microscopique Electronique à Balayage</i> .....	<b>56</b>
<b>I.4. Résultats</b> .....	<b>57</b>
<b>I.4.1. L'évaluation par le typage morphologique</b> .....	<b>57</b>
<b>I.4.2. L'analyse constitutionnelle de calculs</b> .....	<b>60</b>
<i>I.4.2.1 Composition globale des calculs urinaires</i> .....	<b>60</b>
<i>I.4.2.2. Composants majoritaires dans les calculs</i> .....	<b>61</b>
<i>I.4.2.3. Composants majoritaires dans le noyau</i> .....	<b>62</b>
<b>I.4.3. Lithiase et infection</b> .....	<b>63</b>
<b>I.5. Discussions</b> .....	<b>67</b>
<b>I.6. Conclusion</b> .....	<b>71</b>

### II. Lithogénèse d'infection in vitro

<b>II.1. Introduction</b> .....	<b>72</b>
<b>II.2. Matériels et méthodes</b> .....	<b>73</b>
<b>II.2.1. Matériels</b> .....	<b>73</b>

II.2.1.1. Souches bactériennes testées .....	73
II.2.1.2. Conservation des souches bactériennes.....	73
<b>II.2.2. Méthodes</b> .....	<b>73</b>
II.2.2.1. Souche utilisées pour la cristallisation de la struvite.....	73
II.2.2.2. Test de cristallisation in vitro.....	73
II.2.2.3. Identification de la nature des cristaux produits par Spectrophotométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) .....	75
<b>II.3. Résultats</b> .....	<b>76</b>
II.3.1 Pouvoir de cristallisation in vitro.....	76
II.3.2. Evolution de la cristallerie en fonction du temps pour les différentes urines...	77
II.3.2.1. Caractérisation morphologique.....	77
II.3.2.2. Mesure de la turbidité.....	79
II.3.2.3. Mesure du pH.....	81
II.3.3 Analyse à spectrophotomètre infrarouge à transformer de Fourier (FTIR).....	82
<b>II.4. Discussion</b> .....	<b>83</b>
<b>II.5. Conclusion</b> .....	<b>87</b>
<b>III. In vitro, évaluation de l'activité antilithiasique de l'extrait aqueux de <i>Fraxinus excelsior</i> L sur les cristaux de struvite</b>	
<b>III.1. Introduction</b> .....	<b>88</b>
<b>III.2. Matériel et méthodes</b> .....	<b>88</b>
<b>III.2.1. Matériel</b>	<b>88</b>
III.2.1.1. Matériel végétal.....	88
III.2.1.2. Souche utilisées pour la cristallisation de la struvite	89
<b>III.2.2 Méthodes</b>	<b>89</b>
III.2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	89
III.2.2.2. Dosage des polyphénols totaux .....	89
III.2.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux .....	90
III.2.2.4. Test de dissolution des cristaux de struvite.....	90
III.2.2.5. Test d'inhibition de la cristallisation de la struvite .....	91
III.2.2.6. Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) .....	91
<b>III.3. Résultats</b> .....	<b>91</b>
III.3.1 Rendement de l'extraction	91
III.3.2. Total de composés phénoliques et flavonoïdes.....	91
III.3.3. Effet litholytique de <i>Fraxinus excelsior</i> sur les cristaux de struvite.....	92
III.3.4. Effet d'inhibition de la cristallisation de la struvite .....	94
III.3.4.1. En absence d'inhibiteur .....	94
III.3.4.2. En présence d'inhibiteur.....	95
<b>III.4. Discussion</b> .....	<b>96</b>
<b>III.5. Conclusion</b> .....	<b>99</b>

<b>IV. <i>In vitro</i>, évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de <i>Fraxinus excelsior</i> L</b>	
<b>IV.1. Introduction.....</b>	<b>100</b>
<b>IV.2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>101</b>
<b>IV.2.1. Matériel.....</b>	<b>101</b>
<i>IV.2.1. Matériel végétal .....</i>	<b>101</b>
<i>IV.2.2. Souches bactériennes étudiées.....</i>	<b>101</b>
<i>IV.2.3. Conservation des souches.....</i>	<b>102</b>
<i>IV.2.4. Antibiotique .....</i>	<b>102</b>
<b>IV.3. Méthodes .....</b>	<b>102</b>
<b>IV.3.1. Test du pouvoir antibactérien .....</b>	<b>102</b>
<i>IV.3.1.1. Méthode de diffusion en disque.....</i>	<b>102</b>
<i>IV.3.1.2. Méthode de microdilution .....</i>	<b>104</b>
<b>IV.4. Résultats.....</b>	<b>106</b>
<i>IV.4.1. La sensibilité à l'antibiotique testé.....</i>	<b>106</b>
<i>IV.4.2. Le pouvoir antibactérien de l'E.Aq de <i>Fraxinus excelsior</i> par la méthode de diffusion en disque et la méthode de microdilution .....</i>	<b>106</b>
<b>IV.5. Discussion.....</b>	<b>110</b>
<b>IV.6. Conclusion.....</b>	<b>112</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>114</b>
<b>Références bibliographie.....</b>	<b>117</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>143</b>
<b>Liste des publications et des communications</b>	

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**°C** : Le degré Celsius

**µl** : Microlitre

**µm** : Micromètre

**AUA** : AU0 ou acide urique anhydre

**AUD** : AU2 ou acide urique dihydraté

**ATTC** : American Type Culture Collection

**BGN** : Bacilles Gram Négatifs

**C1** : Whewellite ou oxalate de calcium monohydraté

**C2** : Weddellite ou oxalate de calcium dihydraté

**C3** : Oxalate de calcium trihydraté

**CA** : Carapatite

**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Calcium

**CaOx**: Oxalate de calcium

**CHU** : Centre hospitalier universitaire

**CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O** : Urée

**C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>** : Créatine

**COD** : Oxalate de calcium dihydraté

**COM** : Oxalate de calcium monohydraté

**COT** : Oxalate de calcium trihydraté

**DO** : Densité optique

**DRX** : Diffraction des rayons X

**E.Aq** : Extrait aqueux

**ECBU** : Etude cyto bactériologique des urines

**Fig** : Figure

**g** : Gramme

**GN**: Gélose nutritive

**h** : Heures

**H/F** : Rapport Homme/Femme

**IR** : Infrarouge

**IRTF** : Infrarouge à transformée de Fourier

**KBr** : Bromure de potassium

**KCl** : Chlorure de Potassium

**MEB** : Microscope électronique à balayage

**MgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Magnésium

**MH**: Mueller Hinton

**MHB** : Bouillon Mueller Hinton

**mg** : Milligramme

**ml** : Millilitre

**mm**: millimètre

**nm** : Nanomètre

**n°** : Numéro

**Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** : Sodium Oxalate

**Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>** : Sodium citrate

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de Sodium

**NH<sub>4</sub>Cl** : Chlorure d'Ammonium

**PACC** : Phosphates amorphes de calcium carbonatés

**PAM** : Phosphate ammoniaco magnésien

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**TSB**: Bouillon Tryptone Soja

**UAC** : Urate amorphe complexe

**UrAm** : Urate acide d'ammonium

**Wd** : Weddellite

**Wh** : Whewellite

**CMI** : la concentration minimale inhibitrice

**CMB** : les concentrations minimales bactéricides

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification morpho-constitutionnelle des calculs urinaires selon Daudon et <i>al</i> , 2012.....	<b>20</b>
<b>Tableau 2:</b> Critères de l'analyse du calcul orientant vers une infection urinaire lithogène.....	<b>27</b>
<b>Tableau 3:</b> Microorganismes producteurs d'uréase .....	<b>30</b>
<b>Tableau 4 :</b> Les principaux facteurs lithiasiques favorisant dégagés de l'approche morpho-constitutionnelle.....	<b>43</b>
<b>Tableau 5 :</b> Répartition des cas lithiasique selon l'âge.....	<b>57</b>
<b>Tableau 6 :</b> Fréquences des types morphologiques et leurs associations au noyau et en surface des calculs urinaires selon le sexe.....	<b>59</b>
<b>Tableau 7:</b> Fréquence de présence des constituants dans les calculs selon le sexe des patients	<b>61</b>
<b>Tableau 8 :</b> Fréquence des constituants majoritaires dans les calculs selon le sexe des patients	<b>62</b>
<b>Tableau 9 :</b> Fréquence des constituants majoritaires des noyaux selon le sexe des patients.....	<b>62</b>
<b>Tableau 10 :</b> Répartition selon l'âge des patients.....	<b>63</b>
<b>Tableau 11 :</b> Récapitulatif de l'ensemble des résultats (par sexe et tranches d'âge) des types de germes et de l'origine de l'infection .....	<b>66</b>
<b>Tableau 12 :</b> Activité antibactérienne de l'E.Aq de <i>F excelsior</i> vis-à-vis les souches bactériennes testées.....	<b>108</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Appareil urinaire et calcul rénal .....	<b>05</b>
<b>Figure 2:</b> Principales étapes de la lithogénèse .....	<b>14</b>
<b>Figure 3:</b> Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines .....	<b>15</b>
<b>Figure 4:</b> Nature des mécanismes d'inhibition cristalline en regard des différentes étapes de la lithogénèse .....	<b>17</b>
<b>Figure 5:</b> Schéma de la lithogénèse infectieuse .....	<b>29</b>
<b>Figure 6:</b> Cristaux de struvite entourés d'érythrocytes (500X).....	<b>32</b>
<b>Figure 7:</b> Proposition d'algorithme pour la prise en charge des calculs de struvite.....	<b>34</b>
<b>Figure 8:</b> feuille de <i>Fraxinus excelsior</i> L. ....	<b>36</b>
<b>Figure 9:</b> Distribution de <i>Fraxinus excelsior</i> en Europe et Afrique du Nord selon EUROFORGEN (2009).....	<b>37</b>
<b>Figure 10:</b> Matériel et accessoires utilisés dans les analyses morphologiques et infrarouge des calculs urinaires.....	<b>40</b>
<b>Figure 11:</b> Microscope électronique à balayage (MEB) utilisé pour l'observation des lithiases à l'échelle mésoscopique (200nm à 200µm).....	<b>41</b>
<b>Figure 12:</b> Micrographies de Whewellite sous différents typages morphologiques obtenus dans des contextes pathologiques différents.....	<b>46</b>
<b>Figure 13 :</b> Micrographies de Weddellite mettant en évidence une surface en spicules quadratiques (a et b) et une structure radiale en section (c) avec des exemples de la conversion cristalline COD vers COD (d, e et f).....	<b>47</b>
<b>Figure 14 :</b> Micrographies mettant en évidence l'association en surface des composants oxalocalciques COM et COD (a, b et c) et au niveau de section (d, e et f).....	<b>47</b>
<b>Figure 15:</b> Micrographies relatives à des lithiases d'acide urique formé dans différents contextes.....	<b>49</b>
<b>Figure 16:</b> Lithiases de carbapatite (composant prédominant) de morphologie IVa1 majoritaire orientant vers diverses étiologies.....	<b>51</b>
<b>Figure 17:</b> Lithiases de brushite (composant prédominant) de morphologie IVd orientant vers diverses étiologies.....	<b>52</b>
<b>Figure 18:</b> Lithiases de carbapatite sous les sous types IVa1 + IVa2 orientant vers une acidose tubulaire distale (a) et (b) et lithiasse d'infection ayant la whitlockite (sous IVa1) et les protéines (sous VIb) comme composants prédominant (c) et (d).....	<b>53</b>
<b>Figure 19 :</b> Struvite sous les morphologies IVc (100% struvite) et IVb (Struvite + Phosphate calcique). ....	<b>54</b>
<b>Figure 20 :</b> Lithiases de struvite particulière .....	<b>54</b>
<b>Figure 21:</b> Struvite formé sur sondes 2J .....	<b>55</b>
<b>Figure 22 :</b> 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) .....	<b>56</b>

<b>Figure 23 :</b> Micrographies de struvite à l'échelle mésoscopique.....	<b>56</b>
<b>Figure 24 :</b> Histogramme de la réparation des patients lithiasiques selon leur âge et leur sexe.....	<b>58</b>
<b>Figure 25 :</b> Histogrammes des fréquences de la lithiase d'infection par tranche d'âge et le sexe des patients adultes.....	<b>64</b>
<b>Figure 26 :</b> Fréquence des lithiases à germes non uréasiques par sexe et pour chaque tranche d'âge.....	<b>65</b>
<b>Figure 27 :</b> Fréquences des lithiases infectées par sexe et pour chaque tranche d'âge.....	<b>65</b>
<b>Figure 28 :</b> Histogramme donnant les principales étiologies associées à la lithiase liée à l'infection de l'arbre urinaire.....	<b>67</b>
<b>Figure 29:</b> Micrographies obtenues par Microscopie à polarisation révélant les urines synthétiques inoculées ayant formées de cristaux de Struvite à l'exception d' <i>Escherichia coli</i> .....	<b>77</b>
<b>Figure 30 :</b> Micrographie des cristaux de struvite induits par <i>Proteus mirabilis</i> .....	<b>78</b>
<b>Figure 31 :</b> Micrographie des cristaux de struvite induits par <i>Proteus vulgaris</i> .....	<b>78</b>
<b>Figure 32 :</b> Micrographie des cristaux de di-phosphocalcique induit par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>78</b>
<b>Figure 33 :</b> Micrographie des cristaux de struvite induits par <i>Klebsiella pneumonia</i> .....	<b>79</b>
<b>Figure 34 :</b> Micrographie des cristaux de struvite induits par <i>Staphylococcus aureus</i> ....	<b>79</b>
<b>Figure 35:</b> Turbidité due à la croissance cristalline induite par les souches bactériennes testées dans l'urine artificielle (mesurée à 600 nm).....	<b>80</b>
<b>Figure 36 :</b> Variation du pH en fonction du temps.....	<b>82</b>
<b>Figure 37 :</b> spectres FTIR obtenu par l'analyse des cristaux de struvite .....	<b>83</b>
<b>Figure 38 :</b> Arbre (a) et Feuilles (b) de <i>Fraxinus excelsior</i> L.....	<b>89</b>
<b>Figure 39:</b> Courbe d'étalonnage Acide gallique en µg/ml .....	<b>92</b>
<b>Figure 40 :</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine en µg/ml).....	<b>92</b>
<b>Figure 41 :</b> Micrographies des cristaux de struvite induits par <i>Proteus mirabilis</i> après 24h à 37°C de la solution témoin (a-c) et leur analyse IRTF mettant en évidence leur nature et leur prédominance (d) .....	<b>93</b>
<b>Figure 42 :</b> Cristaux induits par <i>Proteus mirabilis</i> en présence de l'E.Aq de <i>F excelsior</i> à une concentration de 0,0625 (a) ; 0,125 (b) ; 0,25 (c) ; 0,5 (d) et 1mg/ml (e) observés au microscope à polarisation et l'analyse IRTF (E.Aq à 1mg/ml) mettant en évidence la nature des composants récoltés.....	<b>94</b>
<b>Figure 43 :</b> Evaluation de l'action inhibitrice en absence (a, A) et en présence de l'extrait aqueux de <i>Fraxinus excelsior</i> à une concentration de 0,0625 (b, B) ; 0,125 (c, C) ; 0,25 (d, D) ; 0,5 (e, E) et 1mg/ml (f, F) observée au microscope à polarisation sur des cristaux de struvite synthétisés chimiquement.....	<b>95</b>

**Figure 44** : Spectre IRTF des cristaux induits chimiquement en présence d'E.Aq de *Fraxinus excelsior* de 0,0625 mg/ml après 30 min d'incubation à 37°C ..... **96**

# ***Introduction Générale***

## Introduction générale

La lithiase urinaire résulte de l'un des troubles les plus communs des voies urinaires. Elle a affligé l'humanité depuis des temps reculés jusqu'à nos jours, elle présente la troisième maladie urologique la plus fréquente dans le monde (Qaader *et al*, 2006; Zarasvandi *et al*, 2014; Alatab *et al*, 2016). Elle est caractérisée par la croissance des cristaux en un gros morceau d'agrégats ou de calculs dans les reins ou du tractus urinaire (Zarasvandi *et al*, 2014). Elle est responsable d'une morbidité considérable et pouvant entraîner une détérioration de la fonction rénale et de même une insuffisance rénale terminale (Chandrajith *et al*, 2006; Sakhaee *et al*, 2012). Leur mode de révélation le plus courant est la crise de colique néphrétique aiguë (Chamy et Rouprêt, 2014).

La formation de calculs rénaux est une affection assez fréquente, elle touche 4 à 20% de la population générale de différents pays, développés ou en voie de développement. Durant ces 30 dernières années, plusieurs études épidémiologiques s'accordent sur le fait que son incidence et sa prévalence sont en nette augmentation. Elle est facilement récurrente et son étiologie est souvent inconnue (Vivek *et al*, 2014; Prezioso *et al*, 2014; El Habbani *et al*, 2021). Cependant, l'analyse de l'aspect morphologique et constitutionnel des calculs contribue des informations nécessaires qui permettent à la compréhension des mécanismes impliqués dans leur lithogénèse. Elle devrait donc être le premier temps de toute enquête étiologique. De ce fait, tous les types de calculs doivent être analysés pour identifier leur composition cristalline, et leur distribution élémentaire (Bazin *et al*, 2006; Daudon 2013; Courbebaisse *et al*, 2016). La détermination de la provenance lithiasique permet de lui opposer des mesures thérapeutiques et prophylactiques efficaces conduisant à l'atténuation ou à l'interruption des récurrences calculeuses (Abdelkhalek *et al*, 2000; Bazin *et al*, 2006; Daudon 2013).

La lithogénèse regroupe l'ensemble des processus qui conduisent à la formation de calculs à partir de cristaux qui naissent, croissent et s'agglomèrent (Maxime, 1996). Elle ne peut pas être due à un seul facteur et peut être due à des troubles métaboliques, des influences hormonales, des médicaments, des conditions et habitudes alimentaires, un apport hydrique insuffisant qui concentre et diminue le volume d'urine, une immobilisation, des lésions ou des obstructions dans la vessie ou rein et à des infections urinaires (Durgawale *et al*, 2010; Zarasvandi *et al*, 2013; Ahmed *et al*, 2016). Ce dernier facteur, sujet de notre thème, nécessite des études d'ordre clinique et biologique (Harrache *et al*, 1997). Dans ce sens, et du point de vue composition, la lithiase infectieuse est généralement caractérisée par le phosphate-ammoniac-magnésien (PAM :  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ ), connue par « struvite » (au nom du

minéralogiste Heinrich Von Struve), « calcul d'infection » et aussi « calcul d'uréase » qui peut se développer rapidement pour former des calculs coralliformes. Leur cristallisation est liée à l'infection des voies urinaires par des micro-organismes uréolytiques, principalement les *Proteus*, qui décomposent l'urée et provoquer une urine persistante et alcaline (Kramer et al, 2000; Biocic et al, 2003). Les calculs d'infection sont parmi les calculs de l'arbre urinaire qui causent les problèmes les plus difficiles, dangereux et complexes en raison du potentiel de complications graves voire létales. Les patients ayant une lithiase de struvite pourraient perdre une fonction rénale en raison d'épisodes obstructifs ou pyélonéphritiques et interventions chirurgicales sur le rein. Ainsi, les patients atteints de calculs de type coralliforme (ou en cornes de cerf) infectés, qui ne reçoivent aucun traitement, ont environ 50% de chances de perdre leurs reins (Chauhan et Josh, 2013).

Le traitement de la lithiase d'infection repose principalement sur trois clés: le premier est d'assurer l'élimination complète de la masse lithiasique, le second est l'utilisation d'antibiotiques efficaces pour traiter l'infection, le troisième, est de prévenir les récurrences (Flannigan et al, 2014). Il se trouve que dans le cas de lithiase d'infection à germes uréasiques, le calcul urinaire peut protéger les germes, et de ce fait, entretenir l'infection même en adoptant une stérilisation des urines par antibiothérapie. De plus, les infections urinaires récurrentes doivent recevoir un traitement supplémentaire pour prévenir les lésions rénales et la formation des calculs rénaux en particulier la struvite (Daudon et al, 1993; Nair et al, 2005). Il est à noter également que dans le cas d'infection urinaire nosocomiale les bactéries sont souvent capables de survivre dans un milieu hostile et développer de multiples résistances aux antibiotiques.

Malgré les progrès des traitements de la lithiase en termes de diversité et de modernisation des techniques urologique, la prise en charge préventive de la récurrence lithiasique n'a malheureusement pas suivi le même élan (Traxer, 2012). Par conséquent, il est temps qu'une thérapie alternative sûre et efficace doit être requis pour la prévention du calcul d'infection en utilisant des plantes médicinales. Il se trouve qu'une telle approche semble prendre de plus en plus de place ces dernières années (Nair et al, 2005).

En Algérie, le recours au traitement traditionnel, comme mesures prophylactiques, se fait souvent à l'automédication et sous la plus simple forme « en tisanes ». L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de la lithiase reste assez ancrée dans les pratiques populaires où elle constitue la principale base curative (Khitri et al, 2016). Cependant, le recours à la phytothérapie, est mal documenté et repose particulièrement sur des recommandations faites par des herboristes. En effet, plusieurs plantes sont recensées et recommandées dans le

traitement de la lithiase urinaire, mais leurs effets par rapport au type de calcul ne sont pas appropriés. Dans une partie de ce travail, on a, pour cet effet, proposé d'évaluer l'efficacité d'une plante de la pharmacopée locale très répondeuse au niveau des hauts plateaux, recommandée dans le traitement de la lithiase urinaire, sur les facteurs lithogènes de struvite et ceci afin de contribuer à la prévention de la survenance des calculs d'origine infectieuse.

Dans le présent travail, on a opté pour trois axes d'étude d'objectifs divers. On a étudié en premier différents aspects épidémiologiques de la lithiase de l'arbre urinaire dans la région Est Algérien pour finalement dégager l'impact de la lithiase d'infection au niveau de cette région. Il s'en est suivi une étude in-vitro sur la germination et croissance ainsi que la cinétique de formation des calculs d'infection par une série des bactéries. Finalement, on s'est orienté sur l'axe préventif en étudiant les effets inhibiteur, litholytique et antibactériens d'une plante médicinale (*Fraxinus excelsior* L) sur les cristaux de struvite.

Dans la présentation de cette thèse, on a considéré deux volets :

Le Premier est consacré à l'étude bibliographique qui traite :

- des généralités la lithiase urinaire.
- de la lithiase d'infection

Le deuxième volet est consacré au travail expérimental et dispatché quatre (04) parties :

- Partie 1 : On a abordé l'étude épidémiologique de la lithiase urinaire au niveau de la région Est-Algérien en adoptant une étude selon une approche morpho-constitutionnelle d'une cohorte de 1553 lithiase urinaire. Les résultats obtenus nous ont permis de dégager l'ampleur de la lithiase d'origine infectieuse et sa répartition selon le sexe et l'âge des patients.
- Partie 2 : On a expérimenté in-vitro la formation de cristaux de struvite dans des urines synthétiques par d'une panoplie de bactéries uréolytiques isolées à partir de patients lithiasiques. Cette étude comprend également l'évaluation de la cinétique de germination et croissance des cristaux précipités pour chaque type de bactérie.
- Partie 3 : On a déterminé, in-vitro, l'effet litholytique et/ou inhibiteur de l'extrait aqueux des feuilles de *Fraxinus excelsior* L sur les cristaux de struvite.
- Partie 4 : On a finalement évalué, toujours in-vitro, l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *Fraxinus excelsior* L.

*Etude*  
*Bibliographique*

## **I. Infection et la lithiase urinaire**

L'infection des voies urinaires constitue un grave problème de santé médical et économique majeur. Elle peut provoquer des cicatrices rénales conduisant à une hypertension secondaire et à une maladie rénale chronique, ainsi à la formation des calculs urinaires. Les taux de récurrence élevés et l'augmentation de la résistance aux antimicrobiens parmi les uropathogènes menacent d'accroître considérablement le poids économique de ces infections (Weichhart *et al*, 2008; Ragaa *et al*, 2012).

### **I.1. Rappel anatomique et physiologique du tractus urinaire**

#### **I.1.1. Système urinaire :**

Le système urinaire ou l'appareil urinaire est un groupe d'organes du corps qui s'occupe de filtrer l'excès de liquide et d'autres substances dans la circulation sanguine (Bangaru *et al*, 2014). Il se compose des voies urinaires supérieures « reins et uretères » et des voies urinaires inférieures « vessie et urètre » (Fig 1). Ces voies coopèrent pour assurer la production, le stockage et l'élimination de l'urine (Velho, 2013). Une infection du système urinaire peut perturber la coordination du système urinaire, entraînant des problèmes de stockage et d'élimination de l'urine.

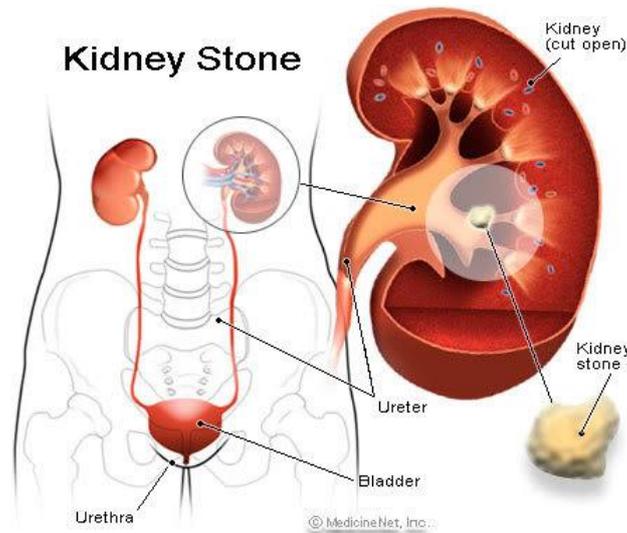
#### **I.1.2. Constitution de l'appareil urinaire**

Le système urinaire comprend les éléments suivants :

- **Les reins** : deux organes qui filtrent les solutés du sang, puis sécrètent, concentrent et excrètent l'urine dans les voies urinaires inférieures via les uretères. Ils sont les principaux organes de l'homéostasie car ils maintiennent l'équilibre acide-base et l'équilibre eau-sel du sang.
- **Les uretères** : deux conduits qui transportent l'urine sur environ 22 à 30 cm des reins à la vessie pour son élimination. La gravité et les ondes péristaltiques à l'intérieur des uretères propulsent l'urine d'une extrémité à l'autre.
- **La vessie** : est l'entrepôt temporaire de l'urine, elle est composée de fibres musculaires lisses. L'urine remplit la vessie à basse pression, ce qui la distend, jusqu'à une capacité normale d'environ 500 ml d'urine chez l'adulte. Près du col de la vessie, à la base inférieure, le muscle lisse est organisé de façon circulaire, ce qui lui permet de servir de sphincter fonctionnel. L'urine est évacuée de la vessie vers l'urètre via l'orifice urétral interne (Bangaru *et al*, 2014; Van, 2001).

- **L'urètre** : est un tube musculaire (d'environ 2 pouces chez la femme et 8 pouces chez l'homme) qui relie la vessie à l'extérieur du corps. Il transporte l'urine de la vessie vers le milieu extérieur (Van, 2001; Livingston, 2016).

Le système urinaire travaille avec les autres systèmes de l'organisme pour maintenir l'homéostasie (Suresh et Das, 2013).



**Figure 1** : Appareil urinaire et calcul rénal (Bangaru et al, 2014).

## **I.2. Infection urinaire**

### **I.2.1. Définitions**

Une infection urinaire s'accorde à l'agression d'un tissu des voies urinaires par un (ou plusieurs) microorganisme(s), produisant une réponse inflammatoire et des signes et symptômes de nature et d'intensité variables selon le terrain. Elle est définie par une bactériurie supérieure à  $10^5$  bactéries/ml et accompagnée d'une leucocyturie pathologique supérieure à  $10^4$ /ml, dans un prélèvement urinaire réalisé de manière aseptique (Atmani et al, 2007).

### **I.2.2. Classification**

Sur le plan clinique, les infections urinaires sont classées selon qu'elles sont simples ou compliquées.

**I.2.2.1. Les infections urinaires non compliquées** : touchent généralement des personnes qui sont par ailleurs en bonne santé et qui ne présentent aucune anomalie structurelle ou neurologique des voies urinaires (Hooton, 2012; Nielubowicz et Mobley, 2010); ces infections

sont différenciées en infections urinaires inférieures (cystite) et supérieures (pyélonéphrite). La cystite est le syndrome urinaire le plus fréquemment rencontré en pratique clinique (Foxman, 2014), dont les symptômes urinaires sont généralement confinés à la vessie. Il s'agit de la dysurie, de la fréquence, de l'hématurie macroscopique, de la sensibilité sus-pubienne et de l'apparition ou de l'aggravation de l'incontinence urinaire ou de l'urgence. La pyélonéphrite est une infection moins fréquente mais plus grave, qui touche le parenchyme rénal. Les patients atteints de pyélonéphrite peuvent présenter de la fièvre et des frissons, des douleurs dorsales, des nausées et des vomissements ; des symptômes urinaires localisés peuvent être présents ou non (Ashraf et al, 2020; Ninan et al, 2014; Hannan et al, 2012; Nicolle, 2001).

**I.2.2.2. Les infections urinaires compliquées** sont définies comme des infections associées à des facteurs qui compromettent les voies urinaires ou la défense de l'hôte, notamment l'obstruction urinaire, la rétention urinaire causée par une maladie neurologique, l'immunosuppression, l'insuffisance rénale, la transplantation rénale, la grossesse et la présence de corps étrangers tels que des calculs urinaire (Flores-Mireles et al ,2015).

### **I.3. Définition de la lithiase urinaire**

Le terme lithiase désigne la maladie caractérisée par la formation de concrétions cristallines dans le système urinaire, les reins, la vessie et/ou les uretères (Wang et al, 2021). « Lithiase » vient du grec lithos (pierre) et celui de calcul du latin *calculus* (caillou). Depuis l'Antiquité, la lithiase urinaire a été appelée maladie de la pierre, la majorité des calculs ressemblant, en fait, à des pierres dont ils ont la solidité. Elle était souvent également désignée sous le nom de gravelle, car les concrétions d'acide urique trouvées dans les urines ressemblaient à de petits graviers (Manassero et al, 2014; Daudon et al, 2012; Joshi et al, 2012).

### **I.4. Historique de la lithiase urinaire**

Les calculs urinaires ont affligé les humains depuis l'aube de l'histoire, et sont allés parallèlement à l'histoire de la civilisation, comme le rapporte une revue récente (Tefekli et Cezayrli, 2013). La maladie était connue à l'époque d'Hippocrate (400 avant notre ère), des alchimistes (1200 avant notre ère) et des chirurgiens barbiers (1400 - 1700 avant notre ère) (Meyers, 2021). Les premières calculs connues ont été découvertes dans des momies égyptiennes, et l'archéologue anglais E. Smith a découvert un calcul vésical, trouvés dans une tombe préhistorique parmi les os du bassin d'un garçon de 15 ans vivant à Al Amrah près d'Abydos dans le présent Jour Egypte, 4800 BCE, en 1901 (Brown, 1901).

Les calculs ont été mentionnés dans les écrits médicaux égyptiens anciens à partir de **1500** avant JC, et la chirurgie pour traiter les calculs a été décrite pour la première fois par Sushruta, un chirurgien indien vivant vers 600 avant JC, qui a fourni des informations détaillées sur les calculs urinaires, l'anatomie urinaire et la chirurgie des calculs dans ses écrits, compilé sous le nom de Sushruta Samhita. Les écrits médicaux de l'ancienne Mésopotamie, de l'Inde, de la Chine, de la Perse, de la Grèce mentionnent tous une telle maladie (Abate et al, 2004; Manfredini et al, 2016; Aulus, 1983).

À notre ère, plusieurs écrits témoignent de la fréquence des calculs vésicaux au cours des siècles passés. Deux types de lithiase bien distincts ont coexisté jusqu'à l'orée du XXe siècle : la lithiase phosphatique pour les enfants des classes pauvres et la lithiase urique pour les adultes des classes aisées. (Daudon et al, 2012)

### **I.5. Prévalence et incidence de la lithiase de l'arbre urinaire**

La lithiase urinaire est un problème urologique courant (Laohapan et al, 2020), qui affecte probablement la population dans tous les pays (Kazumi et al, 2019; Joshi et al, 2020). Les données épidémiologiques récentes démontrent que les taux d'incidence et de prévalence sont plus élevés dans les pays développés et la tendance semble être à la hausse dans les pays en voie de développement. (Romero et al, 2010; Morgan et Pearle, 2010; Zhu et al, 2021; Castiglione et al, 2015; Joshi et al, 2020; Wang et al, 2021).

En effet, de par le monde, la prévalence lithiasique diffère considérablement d'une région à une autre. Elle varie de 1 à 5 % en Asie, 5 à 9 % en Europe, 13 % en Amérique du Nord de 10 à 17 % aux États-Unis et finalement jusqu'à 20 % en Arabie saoudite (Amato et al, 2004; Sun et al, 2011; Knoll et al, 2011, Millán et al, 2011). On estime que 1 à 15% des individus souffrent de formation de calculs urinaires à un moment donné de leur vie. Cette maladie est souvent récurrente et permanente avec un taux de récurrence dépasse 50 % dans les 5 à 10 ans et de 75 % dans les 20 ans suivant le premier épisode lithiasique (Eisner et Goldfarb, 2014; Bouatia et al, 2015). Le taux de réapparition est de 70 à 81 % chez les hommes et de 47 à 60 % chez les femmes (Soundararajan et al, 2006). De plus, le taux d'occurrence est trois fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes, en raison de l'amélioration de la capacité de la testostérone et de la défaillance de celle des œstrogènes dans la formation de calculs (Jyothi et al, 2012).

En Italie, plusieurs études réalisées au cours des 15 dernières années ont observé une progression moyenne de la prévalence de la lithiase de 47 % (10,1 % des hommes et 5,8 % des femmes avaient des antécédents de lithiase) (Trinchieri et al, 2000; Serio et Fraioli, 1999).

En Espagne, l'étude d'[Alapont et al. \(2001\)](#) a mentionné une incidence de 2,66 pour mille habitants par an, montrant une prédominance masculine avec un ratio H/F de 1,26/1. L'âge moyen était de 51,34 ans.

En France, l'étude réalisée par [Daudon et ses collaborateurs. \(2007\)](#), entre 2001 et 2004, a montré que les hommes étaient plus touchés que les femmes avec un ratio hommes/femmes (H/F) globale est de 2,63. L'âge moyen des patients était en moyenne de 49 ans pour les hommes et de 47 pour les femmes.

En Belgique, [Castiglione et al. \(2015\)](#) ont rapporté que la maladie touche davantage l'homme que la femme avec un ratio H/F de 2,25. Le pic de prévalence lithiasique s'observe entre l'âge de 50 et 60 ans dans les deux sexes.

Une étude menée aux États-Unis a révélé que l'incidence à vie de la maladie lithiasique était de plus de 12 % chez les hommes et de plus de 6 % chez les femmes, et qu'environ un tiers des patients présentaient une récurrence dans les 5 ans ([Curhan, 2007](#)).

En Asie, la maladie s'est étendue à travers l'Asie occidentale et l'Asie du Sud, y compris la Corée du Sud et le Japon, avec des taux de prévalence allant de 5 à 19,1 % ([Tae et al, 2018](#); [Sak et al, 2019](#)). Chez la population taïwanaise, ils ont conclu que la prévalence est voisine de 9,6 % (14,5 % des hommes et 4,3 % des femmes) ([Lee et al, 2002](#)). De plus, la prévalence des calculs rénaux est passée de 4 à 6,4 % au cours des 30 dernières années en Chine ([Zeng et al, 2017](#)).

À Bagdad, une étude publiée en 2006 ([Qaader et al, 2006](#)) a rapporté que les hommes (71,7 %) étaient plus sujets aux calculs urinaires que les femmes (28,3 %), avec un ratio de 2,5/1.

A Burkina Faso, une étude réalisée entre 1993 et 2002, a noté que la prévalence était de 1.54 % avec une prédominance masculine dont l'âge moyen des patients était de 35 ans ([Kambou et al, 2005](#)).

Au Maroc (Meknès), entre 2002 et 2007, ils ont prouvé que cette pathologie touche 60,8% des hommes et 39,2% de femmes (l'âge moyen est de  $44,45 \pm 12,9$  ans) et que le pic de fréquence se situe chez les deux sexes entre 41 et 50 ans ([Laziri et al, 2009](#)). Une autre étude Marocaine (Rabat-Salé) réalisée entre 2008 et 2013, à montrer que le sex-ratio global H/F était de 2,03/1 et la majorité des patients étaient âgés de 40 à 60 ans ([Bouatia et al, 2015](#)).

Au niveau de l'Ouest Algérien, [Djelloul et al. \(2006\)](#) ont montré que la répartition des calculs était à une prédominance masculine comme on l'observe dans les autres pays du monde avec un rapport H/F trouvé à 2,24. Dans une étude englobant la région Est Algérien, la lithiase urinaire est également à prédominance masculine mais avec un ratio H/F de 1,32 ([Bousslama et al, 2015](#)).

En Tunisie, [Alaya et ces collaborateurs. \(2012\)](#) ont indiqué que le rapport H/F global était à 1,5/1 avec un net pic de fréquence des calculs dans la tranche d'âge de 40 à 69 ans.

Cependant, dans les pays occidentaux, la fréquence de la lithiase rénale a triplé durant les 50 dernières années, avec une tendance montrant que les femmes pourraient être presque aussi touchées que les hommes ([Lieske et al, 2006](#); [Kittanamongkolchai et al, 2018](#)). En Chine, des études ont aussi confirmé ces tendances où il est rapporté que la prévalence des calculs urinaire était de 6,5 % chez les hommes et de 5,1 % chez les femmes (5,8 % chez les adultes) ce qui correspond à environ 1 adulte touché sur 17 ([Zeng et al, 2017](#); [Zhu et al, 2021](#)).

Des études récentes, ont signalé que plus de 30800 cas d'hospitalisations et environ de 550000 visites aux urgences avaient de lithiase urinaire en Angleterre et aux États-Unis successivement, pour chaque année, dont l'âge maximal d'incidence se situe entre 35 et 55 ans. ([Bultitude et Rees, 2012](#); [Aditya et al, 2019](#)).

Certaines études ont indiqué qu'une augmentation de la fréquence de la lithiase urinaire est attendue, en raison de multiples facteurs lithogéniques, notamment l'âge, le sexe, des modifications dans le mode de vie, les habitudes alimentaires, l'apport hydrique, le réchauffement climatique, la profession, le statut socio-économique, ainsi que les maladies génétiques et métaboliques. ([Brikowski et al, 2008](#); [Romero et al, 2010](#); [Ziemba et Matlaga, 2017](#); [Liu Y et al, 2018](#)). Cependant, les facteurs précis responsables de la prévalence à la hausse et de la récurrence de cette pathologie n'ont pas encore été identifiés. En raison de sa forte prévalence chez les adultes, cette maladie a un impact important sur l'individu et la société, et, de ce fait, elle est devenue donc un problème de santé publique ([Abeywickrama et al, 2016](#); [Wang et al, 2019](#)).

### **I.6. Lithogénèse**

Le terme lithogénèse regroupe l'ensemble des processus physicochimiques et biologiques qui conduisent, au développement d'un calcul urinaire ([Daudon, 2013](#); [Tilahun et Beyene, 2018](#)). La formation des calculs urinaires se déploie selon quatre étapes essentielles dont la

formation d'une phase insoluble, une augmentation de la taille des particules formés, il s'en suit une rétention de ces dernières à un niveau des voies excrétrices (nucléation) et enfin l'accrétion ou la croissance du calcul autour d'un noyau. Il est vrai que la majorité des calculs sont formés de substances cristallines où des processus de cristallisation sont mis en œuvre pendant leur germination et leur croissance. On doit cependant tenir compte aussi des substances lithiasiques non cristallines dans les processus de lithogénèse. L'ensemble de ces processus sont regroupés dans six théories de lithogénèse qui sont :

1. *Théorie de la Sursaturation–Cristallisation;*
2. *Théorie du déficit en inhibiteur de cristallisation;*
3. *Théorie de l'excès en inducteurs de cristallisation;*
4. *Théorie des corpuscules papillaires calcifiés;*
5. *Théorie de la lithogénèse infectieuse;*
6. *Théorie de la matrice protéique lithogène.*

### **I.7. Etapes de la lithogénèse**

Le processus physique de formation du calcul est une cascade complexe d'événements. Les calculs rénaux résultent de la croissance de cristaux en calculs. Le processus de formation des calculs dépend du (Bangaru et al, 2014) :

- Volume urinaire;
- Concentrations d'ions calcium, phosphate, oxalate et sodium;
- Concentrations d'inhibiteurs naturels du tartre;
- *pH* urinaire.
- Protection de l'épithélium urinaire contre l'adhérence cristalline (Daudon, 2013).

Des niveaux élevés d'ions, un faible volume urinaire, un *pH* bas et de faibles niveaux de citrate favorisent la formation de calculs urinaires. La pathogénèse de la formation de calculs urinaires est le résultat final des processus physico-chimiques fondamentaux suivants en plusieurs étapes (Fig 2) (Bangaru et al, 2014; Aggarwal et al, 2013; García-Perdomo et al, 2016; Daudon, 2008).

#### **I.7.1. Sursaturation des urines**

L'urine est un liquide métastable qui contient plusieurs substances capables de former des particules solides. Ces composés peuvent être présents à des concentrations super sursaturées (Grases et al, 2011). L'événement central dans la formation des calculs est la sursaturation.

Celle-ci est obtenue lorsqu'une solution contient une quantité de matière dissoute supérieure à celle qui est normalement nécessaire à la saturation du solvant (Daudon et al, 2008).

De ce fait, elle se produit lorsque la concentration des substances formant les calculs urinaires augmente dans l'urine, ou lorsque aussi, lors d'une baisse conséquente du volume urinaire. L'absence ou la réduction des inhibiteurs de la cristallisation des calculs urinaires reste aussi un facteur déterminant de lithogénèse. Cette dernière, dépend également du pH urinaire, de la force ionique, de la concentration du soluté et de la complexation. Le niveau de supersaturation d'un sel est exprimé par le rapport entre le produit d'activité ionique réel (sel AP) et le produit de solubilité (sel SP). Le point auquel la saturation d'une solution est atteinte et où la cristallisation commence est communément appelé produit de solubilité thermodynamique ( $K_{sp}$ ) (Aggarwal et al, 2013; Dradamanis et al, 2013).

L'urine contient naturellement des inhibiteurs de cristallisation et peut maintenir de grandes concentrations de soluté au-dessus du  $K_{sp}$ , un état métastable. La concentration du soluté ayant atteint, en augmentant, un point où le soluté ne peut être maintenu en solution est connu sous le nom de coefficient de filtration, qui correspond au point de formation du produit dans l'urine. Ainsi, la sursaturation de l'urine constitue une force motrice au sein de la solution qui peut conduire à la cristallisation et déclencher une série d'événements physiopathologiques comprenant la nucléation, la croissance, l'agrégation des cristaux et la fixation aux épithéliums (Bangaru et al, 2014).

Le processus de cristallisation dépend donc de la thermodynamique et de la cinétique d'une solution sursaturée (Daudon et al, 2008; Wang et al, 2014; Saljoughian, 2020).

### ***1.7.2. Germination ou nucléation cristalline***

La sursaturation urinaire à elle seule ne peut expliquer la formation de calculs urinaires. L'étape de la nucléation est la formation d'une phase cristalline solide dans une solution reste essentielle dans la formation des calculs urinaires.

La nucléation implique l'association de cristalloïdes en solution pour former des particules sub-microscopiques (Basavaraj et al, 2007; Bangaru et al, 2014). Elle peut s'exprimer selon deux sortes :

***1.7.2.1. La nucléation homogène*** se produit lorsque la cristallisation se déroule spontanément dans une solution pure, dont le niveau de sursaturation est élevé (Daudon et al, 2008). Comme

des impuretés sont toujours présentes dans l'urine humaine, la nucléation homogène a peu de chances de se produire *in vivo*.

**I.7.2.2. La nucléation hétérogène** se produit généralement à un niveau de sursaturation inférieur à celui requis pour la nucléation homogène. Les sites de nucléation hétérogène dans l'urine peuvent être des cellules épithéliales, des globules rouges, des débris cellulaires, des plâtres urinaires, d'autres cristaux et des bactéries. Les surfaces fournies par les impuretés peuvent servir de nidus dans le processus de nucléation, conduisant à la nucléation hétérogène (Bangaru *et al*, 2014). De plus, la matrice organique, le muco-polysaccharide, agit comme un agent de liaison en augmentant la nucléation (Ahmed *et al*, 2016). La nucléation des composants cristallins peut se produire dans les lumières des tubules rénaux, dans les membranes basales des cellules tubulaires, ou dans les deux sites, selon le type de calcul Bangaru *et al*, 2014; (Aggarwal *et al*, 2013).

### **I.7.3. Croissance cristalline**

Les cristaux générés par une sursaturation élevée des urines sont d'abord très petits (moins de 100nm) et ne posent donc pas un risque lithiasique. 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 et dures de calcul appelée croissance cristalline, inclus, selon les espèces cristallines et la composition urinaire, de 1 à 100µm (Daudon, 2008; Tilahun et Beyene, 2018). Une fois qu'un nidus est atteint, l'énergie libre globale est diminuée en ajoutant de nouveaux composants cristallins à sa surface. L'énergie libre totale du cluster est augmentée de l'énergie de surface.

La croissance cristalline est l'étape majeure suivante de la formation des calculs urinaires. Au cours de ce processus, les petits cristaux (moins de 100nm) générés par une sursaturation élevée des urines, selon une disposition géométrique précise, vont grossir plus ou moins rapidement par captation de nouvelles molécules de la substance sursaturée présente dans l'urine. Ainsi, sera formé des particules plus grosses et dures et la croissance cristalline, incluse, selon les espèces cristallines et la composition urinaire, les particules de 1 à 100µm (Daudon, 2008; Tilahun et Beyene, 2018).

La croissance des cristaux est déterminée par la taille et la forme des molécules, les propriétés physiques du matériau, les niveaux de sursaturation, le pH de la solution et les défauts présents dans la structure du cristal. La combinaison de l'agrégation et de la croissance cristalline peut expliquer la genèse des calculs urinaires (Bangaru *et al*, 2014). Cependant, Le

processus de croissance des calculs est lent et nécessite plus de temps pour obstruer les tubules rénaux (Basavaraj et al, 2007).

#### ***1.7.4. Agrégation des cristaux***

Contrairement à la croissance, l'agrégation cristalline est un processus qui peut être très rapide, au cours duquel les noyaux cristallins se lient les uns aux autres pour former des particules volumineuses, dépassant parfois 200 µm, plus grandes est appelé agrégation. Les noyaux initiaux peuvent croître par l'ajout ultérieur de sels souhaités. L'agrégation des particules en solution est déterminée par un équilibre de forces, certaines ayant des effets d'agrégation et d'autres des effets de désagrégation. Une petite distance inter-particulaire augmente la force d'attraction et favorise l'agrégation des particules. L'agrégation des cristaux joue un rôle important dans la formation des pierres (Daudon, 2008; Daudon, 2013).

#### ***1.7.5. Agglomération cristalline***

Un phénomène dans lequel les cristaux sont agglomérés formant des particules multi-composant urinaire, qui par leurs nombreuses charges négatives, capables de 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, participant donc à l'architecture du calcul (Vidyashree et al, 2021; Daudon et al, 2008).

#### ***1.7.6. Rétention des particules cristalline***

La rétention des cristaux se produira si les cristaux deviennent suffisamment gros pour être piégés dans les tubules rénaux (Bangaru et al, 2014). En effet, l'attachement des cristaux développés à la paroi tubulaire rénale des cellules épithéliales est appelé rétention cristalline ou contact entre les cellules cristallines (Tsujiyata, 2008). Cette étape peut être envisagée comme la première étape de la lithogène proprement dite, à partir de laquelle des substances cristallines générées au cours des différentes phases de la cristallogénèse vont être retenues dans le tractus urinaire ou le rein et croître pour former un calcul (Daudon et al, 2008).

#### ***1.7.7. Croissance et évolution du calcul***

Au niveau du tractus urinaire, le calcul peut grossir en fixant de nouveaux cristaux ou en attrapant de nouvelles molécules (calculogénèse). Cette croissance se fait à une vitesse variable qui dépend de l'environnement physico-chimique, un calcul de 10 mm de diamètre se formant sur une période comprise de quelques mois jusqu'à 15 ou 20 ans selon le degré ou la stabilité de l'activité cristallogène de l'urine (Daudon, 1989; Daudon, 2000; Marshall et al, 2007).

La croissance n'est pas le seul mode d'évolution spontanée que subit un calcul retenu dans les tractus urinaires. En effet, d'autres processus peuvent se produire, qui vont emmener à des changements de phases cristallines. Ils proviennent de l'instabilité de certaines formes hydratées qui ont aptitude à évoluer peu à peu dans le temps vers des formes thermodynamiquement plus stables et moins hydratées (Daudon *et al*, 2012).

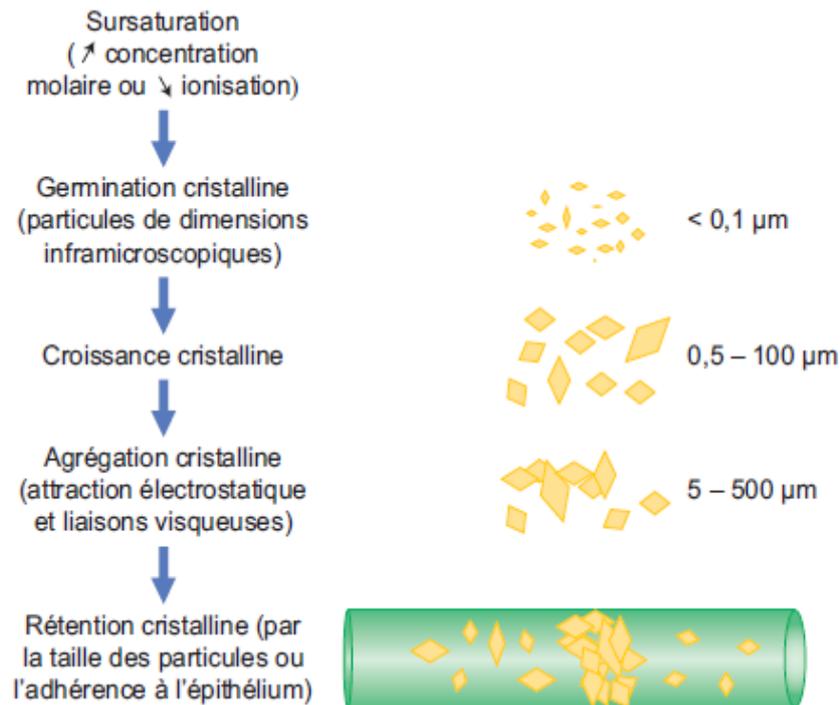


Figure 2 : Principales étapes de la lithogénèse (Daudon *et al*, 2012)

### I.8. Promoteurs et inhibiteurs de la lithogénèse

La sursaturation et la cristallisation urinaires sont la force motrice des précipitations de cristal intra-rénales et est principalement causée par des maladies héréditaires ou acquises associées à une altération de la fonction rénale. De plus, la sursaturation et la cristallisation urinaires sont influencées par le pH de l'urine et les concentrations spécifiques de substance en excès, notamment CaOx, CaP, acides uriques et urates, struvite, acides aminés (cystéine), purines (2,8-dihydroxyadénine et xanthine) et médicaments (atazanavir, sulfaméthoxazole, amoxicilline, ceftriaxone) (Rodgers, 2017; Daudon *et al*, 2018).

La formation et le développement des cristaux sont influencés par plusieurs molécules de modulateur, appelées récepteurs, promoteurs et inhibiteurs.

### 1.8.1. Promoteurs de la formation de calculs

Les promoteurs sont des substances qui stimulent la création de calculs par divers mécanismes (Fig 3). Certains des promoteurs comprennent les lipides de la membrane cellulaire (phospholipides, cholestérol et glycolipides) (Khan et Kok, 2004), l'amélioration de l'hormone calcitriol en activant l'hormone parathyroïdienne (Centeno et al, 2009), l'oxalate, le calcium, le sodium, la cystine et un faible volume d'urine (Basavaraj et al, 2007). Parmi les formateurs de calculs récurrents, l'excrétion d'oxalate urinaire s'est avérée plus élevée, tandis que l'excrétion de citrate était plus faible (Cakiroglu et al, 2016).

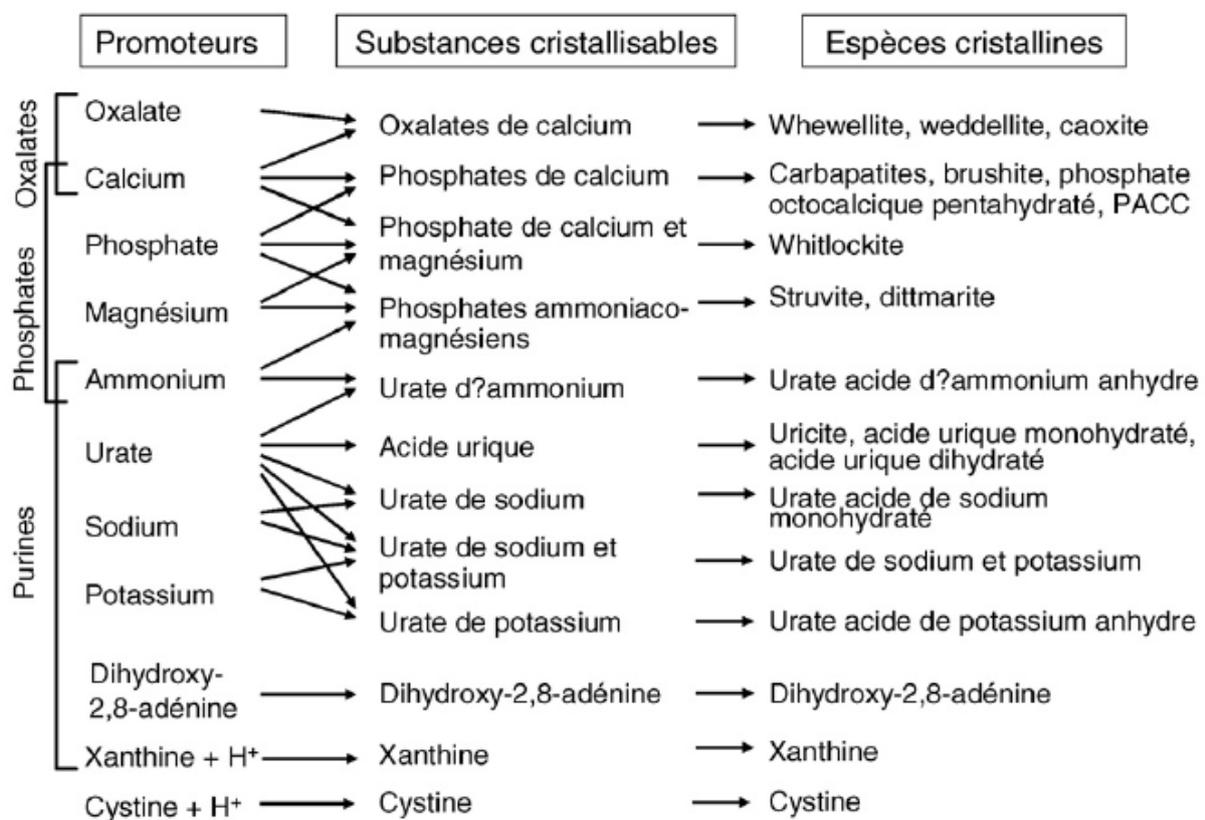


Figure 3 : Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines (Daudon et al, 2008)

### 1.8.2. Inhibiteurs de la formation de calculs

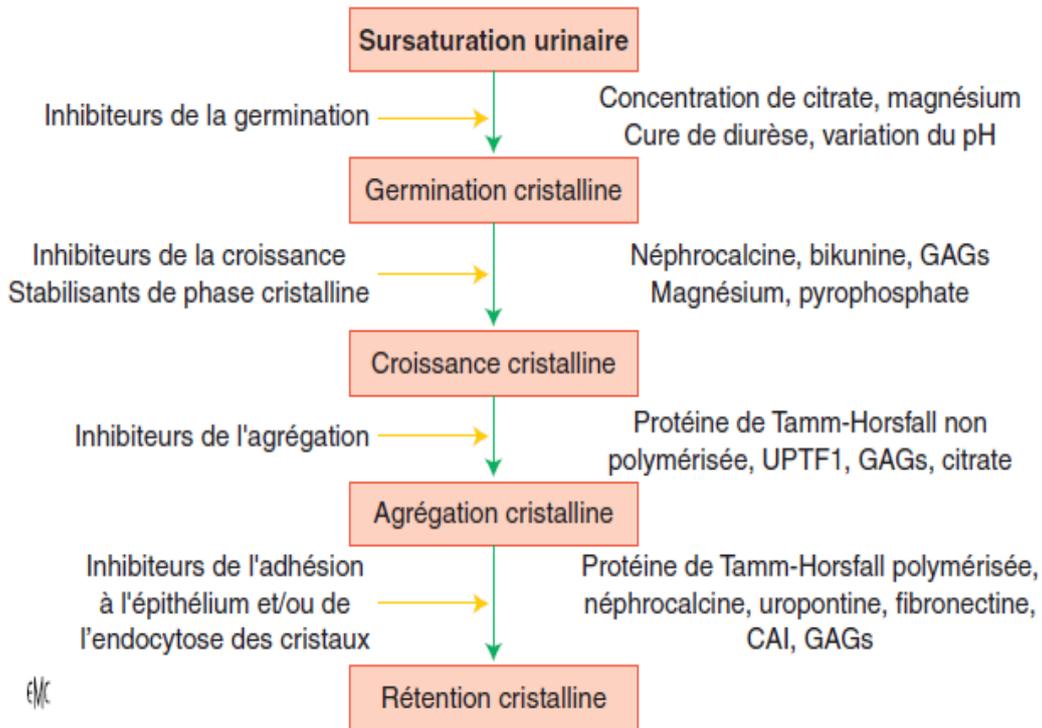
Les inhibiteurs sont des substances qui agissent à la fois en compétition et en coopération, réduisant ainsi l'initiation de la sursaturation, de la nucléation, de la croissance cristalline, inhibant l'agrégation et/ou l'adhésion des cristaux aux cellules épithéliales tubulaires ou de tout autre processus nécessaire à la formation des calculs (Fig 4). Normalement, l'urine contient des

produits chimiques qui empêchent la formation de cristaux (Schepers *et al*, 2002; Basavaraj *et al*, 2007).

Les inhibiteurs dans l'urine peuvent être divisés en trois groupes : de petits anions organiques comme le citrate qui peuvent inhiber très efficacement la croissance des cristaux, à des concentrations supérieures à 0,1 mM (Khan *et al*, 2004, Hess *et al*, 2000), de petits anions inorganiques tels que les pyrophosphates, des cations métalliques multivalents comme le magnésium ou des macromolécules qui sont les inhibiteurs les plus efficaces de la croissance cristalline, plus précisément, l'ostéopontine, les glycosaminoglycanes, les glycoprotéines, le fragment de prothrombine urinaire-1 (UPTF-1) et les protéines de Tamm-Horsfall (THP) (Khan *et Kok*, 2004; Ratkalkar *et Kleinman*, 2011; Aggarwal *et al*, 2013).

Ces inhibiteurs ne semblent pas fonctionner de la même manière pour tout le monde; par conséquent, certaines personnes développent des calculs. Cependant, si les cristaux formés restent minuscules, ils traversent généralement les voies urinaires et sortent du corps avec des éclaboussures d'urine sans être remarqués.

Les inhibiteurs peuvent agir soit directement en interagissant avec le cristal, soit indirectement en influençant l'environnement urinaire (Khan *et Kok*, 2004). Lorsque les composés inhibiteurs s'adsorbent sur la surface du cristal, ils inhibent la nucléation, la croissance cristalline, l'agrégation ou l'adhérence aux cellules cristallines est inhibée (Basavaraj *et al*, 2007).



**Figure 4 :** Nature des mécanismes d'inhibition cristalline en regard des différentes étapes de la lithogénèse (Daudon, 2013)

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

### I.9. Facteurs de risque de la lithiase urinaire

Les facteurs de risque de formation de calculs rénaux comprennent, entre autres, un faible apport en liquide, une hypercalciurie, un régime riche en sel et une hyperparathyroïdie primaire. L'apport en liquide contribue à la formation de calculs par le biais d'une urine concentrée, provoquant une sursaturation et une cristallisation des composés formant les calculs. Un autre mécanisme est la diminution du débit urinaire, qui en retour provoquera probablement la disposition des cristaux sur l'urothélium. Un débit urinaire inférieur à 1 L/jour présente un risque nettement accru de formation de calculs. Les calculs rénaux ne doivent pas être considérés comme un diagnostic en soi, mais plutôt comme le symptôme d'une anomalie sous-jacente (Alblowi et al, 2022).

Les facteurs de risque de formation de calculs rénaux peuvent être classés en facteurs non alimentaires, alimentaires et urinaires. Les facteurs non alimentaires comprennent les antécédents familiaux de calculs, les troubles systémiques tels que l'hyperparathyroïdie

primaire et les facteurs environnementaux, principalement dans les environnements chauds (Dawson CH, Tomson, 2012; Safarinejad, 2007). Au contraire, les facteurs alimentaires comprennent une consommation excessive de calcium, de protéines animales, d'oxalate, de sodium, de potassium, de magnésium et de saccharose ; une diminution de la consommation de fibres a également été impliquée comme facteur de risque possible (Scales et al, 2012; Penniston et al, 2021). Un faible apport en calcium est un facteur connu contribuant à un taux élevé d'oxalate urinaire, qui est un déchet excrété par l'urine et qui contribue à la formation de calculs. Il faut être prudent lors de la consommation de protéines animales, car elles sont métabolisées en oxalate et en acide urique. Par conséquent, le fait que les médecins de soins de santé primaires soient informés des facteurs de risque joue un rôle majeur dans la prévention de l'incidence, de la récurrence et du développement de la maladie et des complications associées. Les médecins ont un rôle important à jouer dans l'éducation de la population saine et de celle à risque par le biais d'une intervention diététique appropriée et de la transmission de connaissances (Ferraro et Bargagli, 2020; 2021).

#### **I.10. Classification morpho-constitutionnelle et orientations étiologiques**

Il est connu que la lithiase urinaire a un fort potentiel de récurrence, d'où la nécessité d'identifier les espèces cristallines constitutives des calculs et leur type morpho-constitutionnel dès le premier épisode de la maladie afin de déterminer les principaux facteurs lithogènes responsables de la formation d'un calcul donné, ainsi d'initier des mesures préventives adéquates (Daudon et al, 2008; Diangienda et al, 2021).

Cette identification se fait actuellement par la méthode de classification morpho-constitutionnelle (CMC), établie par le Pr Michel Daudon, elle s'est avérée cruciale dans la prise en charge du patient car cette méthode met en corrélation les caractéristiques morphologiques des calculs avec des troubles métaboliques spécifiques à l'origine de l'urolithiase. (Daudon et al, 1993; Pozdzik et al, 2021). Elle également fournit des informations d'intérêt clinique pour le diagnostic étiologique et la stratégie thérapeutique (Daudon et al, 2016; Roger et al, 2020).

La classification morpho-constitutionnelle des calculs distingue 07 types subdivisés en 21 sous-types selon la composition cristalline et la forme, la couleur et la structure des calculs identifiés dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 1. Cette méthode très spécifique est facile à apprendre et offre la possibilité d'identifier rapidement des maladies très récurrentes, parfois graves dans leurs conséquences cliniques. En effet, les sous-types Ic, Ie, IIIId, IVa<sub>2</sub> et V sont pathognomoniques d'entités cliniques spécifiques correspondant

respectivement à l'hyperoxalurie primaire de type 1, l'hyperoxalurie entérique, l'hyperuricosurie avec diarrhée, l'acidose tubulaire distale et la cystinurie. En 2019, l'International COLlaborative NEtwork on Kidney sTones (ICONEKT) a encouragé la communauté médicale à intégrer cette méthode pour une identification rapide des troubles responsables des maladies hautement récurrentes (Pozdzik *et al*, 2019).

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

Caractéristiques structurales des calculs whewellite (type I)				
SOUS-TYPE	PRICIPALE PHASE CRISTALLINE	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
<b>Ia</b>	Whewellite	Surface mamelonnée. Section faite de couches concentriques à cristallisation radiale. Couleur : brun ± foncé. Ombilication et plaque de Randall fréquentes		
<b>Ib</b>	Whewellite	Surface mamelonnée et rugueuse. Pas d'ombilication. Section inorganisée. Couleur : brun à brun foncé		
<b>Ic</b>	Whewellite	Surface bourgeonnante. Section finement granuleuse et peu organisée. Couleur claire, crème à brun-jaune clair		
<b>Id</b>	Whewellite	Surface lisse. Section faite de couches concentriques fines. Couleur : beige ou brun clair		
<b>Ie</b>	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	PRICIPALE PHASE CRISTALLINE	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
<b>IIa</b>	Weddellite	Surface spiculée montrant des cristaux bipyramidaux agrégés avec des angles et des arêtes vifs. Section à cristallisation radiale lâche. Couleur : brun-jaune clair		
<b>IIb</b>	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		
<b>IIc</b>	Weddellite	Surface rugueuse. Section : inorganisée au centre avec une coque à structure concentrique diffuse en périphérie. Couleur : gris-beige à brun-jaune foncé		

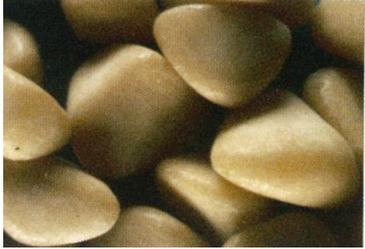
**Caractéristiques structurales des calculs d'Acide urique ou d'autres (type III)**

SOUS-TYPE	PRICIPALE PHASE CRISTALLINE	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
<b>IIIa</b>	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		
<b>IIIb</b>	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		
<b>IIIc</b>	d'ammonium l'urate acide Urates, incluant	Surface homogène, rugueuse et localement poreuse. Couleur beige à grisâtre. Section inorganisée poreuse. Couleur: blanchâtre à grisâtre		
<b>III d</b>	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	PRICIPALE PHASE CRISTALLINE	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
IVa1	Carbapatite	Surface rugueuse homogène. Section : peu organisée ou faite de couches concentriques diffuses. Couleur : blanchâtre à beige		
IVa2	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	PRICIPALE PHASE CRISTALLINE	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE	SECTION
<b>Va</b>	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		
<b>Vb</b>	Cystine	Surface lisse. Section : couches concentriques en périphérie, centre inorganisé. Couleur: crème à jaunâtre		

**Caractéristiques structurales des calculs de Protéines (type VI)**

SOUS-TYPE	PRICIPALE PHASE CRISTALLINE	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES	SURFACE ET SECTION
<b>VIa</b>	Protéines	Calculs matriciels mous. Surface homogène. Section inorganisée. Couleur : crème a brun-jaune clair	
<b>VIb</b>	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	
<b>VIc</b>	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'infection

La relation entre les infections et les calculs rénaux est connue depuis l'époque d'Hippocrate, mais ce n'est qu'en 1817 que Marcet a identifié le lien entre l'alcalinité urinaire, l'infection, les calculs de phosphate et l'augmentation de l'ammoniac urinaire. En 1901, Brown a suggéré pour la première fois que l'activité des bactéries de division de l'urée augmentait la production d'ammoniac urinaire, ce qui était la cause immédiate de l'augmentation des niveaux d'alcalinité urinaire et de la formation de calculs de phosphate (struvite). La description de l'uréase en 1926, la première enzyme jamais isolée et purifiée, a valu à Sumner le prix Nobel de chimie en 1946. La struvite a été découverte pour la première fois dans des excréments de chauve-souris par le géologue suédois Georg Ulex, qui l'a nommée en l'honneur de son ami le diplomate et naturaliste russe, le baron von Struve.

Les infections des voies urinaires peuvent modifier la composition de l'urine, entraînant un risque accru de formation de plusieurs types de calculs urinaires. Les souches bactériennes dotées d'une activité uréase, autrement appelées bactéries uréolytiques, peuvent hydrolyser l'urée, ce qui entraîne une augmentation des concentrations urinaires d'ammonium et de bicarbonate en présence d'eau. L'augmentation du bicarbonate urinaire provoque l'alcalinisation de l'urine et, avec l'augmentation de l'ammonium urinaire, augmente la saturation urinaire en struvite ou phosphate de magnésium et d'ammonium ( $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ ) et en carbonate d'apatite ( $Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$ ) (Halinski *et al*, 2023).

De plus, une urine très alcaline et une concentration élevée d'ammoniac urinaire agissent localement en endommageant les glycosaminoglycane qui constituent la couche superficielle de l'urothélium pour protéger les cellules d'une invasion bactérienne (Flannigan *et al*, 2014; Rahman *et al*, 2003). Un biofilm bactérien se forme alors à la surface de l'urothélium du bassin et des calices rénaux, dans lequel précipitent des cristaux de struvite et d'apatite (Hobbs *et al*, 2018). Les bactéries, à leur tour, produisent des polysaccharides extracellulaires et des lipopolysaccharides, contribuant à la croissance rapide du calcul par l'apposition rapide ultérieure des couches de matière minérale mélangées et maintenues ensemble par la matière organique (Arkusz *et al*, 2021; Nickel *et al*, 1994). Un nuage de matière cristalline se forme autour des bactéries, qui tend à précipiter autour des bactéries et à l'intérieur des bactéries elles-mêmes, avec la formation de microlithes après bactériolyse (Prywer *et Torzewska*, 2019). Ces mécanismes expliquent la croissance rapide de ces types de calculs, qui ont tendance à remplir toutes les cavités rénales pour former un moulage des cavités et prendre un aspect coralliforme ou en staghorn (cornes de cerf).

La présence de struvite, même en faible quantité affirme l'origine infectieuse du calcul. Lorsqu'elle est localisée dans le noyau, l'infection est à l'origine de la formation du calcul, sinon, lorsqu'elle est présente dans les couches périphériques (et absente dans le noyau) on aura un cas de surinfection où l'infection est secondaire à une cause initiale de type métabolique. En pratique, la struvite se forme presque exclusivement en association avec une infection des voies urinaires causée par des bactéries productrices d'uréase (Torzewska et al, 2003; Rozalski et al, 1997).

Toutefois, en absence de struvite, plusieurs critères orientent vers l'origine infectieuse d'une lithiase :

- Carbapatite ayant un taux carbonatation élevé : Un taux de carbonatation supérieur à 17% atteste l'implication d'un processus infectieux par des bactéries uréolytiques dans la formation de la Carbapatite (Carpentier et al, 2009; Bruyere et al, 2008; Englert et al, 2013).
- La nature des constituants : Calcul contenant en plus de la Carbapatite, la Whitlockite (phosphate mixte de calcium et de magnésium), le PACC (phosphate amorphe de calcium carbonaté) et l'urate acide d'ammonium suggère une formation avec un processus infectieux (Lomas et al, 2017; Chou et al, 2012).

**Tableau 2** : Critères de l'analyse du calcul orientant vers une infection urinaire lithogène (Saussine, 2008)

Informations tirés du calcul	critères	Significations cliniques
Struvite	Présence	Infection à micro-organismes uréasiques
Taux de carbonate des phosphates calcique (CA et PACC)	≥17%	Infection à micro-organismes uréasiques
Association CA et/ou PACC et UrAm	Présence	Infection à micro-organismes uréasiques + Hyperuricurie
UrAm	Type IIIc	Infection à micro-organismes uréasiques + Hyperuricurie
PACC	≥10%	Infection à micro-organismes uréasique ou non selon le taux de carbonate
Whitlockite	≥20%	Infection à micro-organismes uréasique ou non selon les autres critères présents
Protéines (distribution diffuse dans le calcul)	>5%	Infection urinaire
Acide urique	+filaments mycéliens	Candidose urinaire

CA : Carbapatite, PACC : Phosphate Amorphe de Calcium Carbonaté, UrAm : Urate acide d'ammonium

## II.1. Définition de la lithiase d'infection

La lithiase infectieuse est un cas particulier de lithogénèse caractérisé par la nature de ses composants, principalement le phospho-ammoniac-magnésien (PAM ou struvite) associée généralement à la Carapatite (Carbonate apatite). En pratique, cette lithiase résulte d'une infection chronique des tracts urinaires par des bactéries possédant une uréase active (Siener, 2006).

La struvite est un minéral phosphaté dont la composition chimique est  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$  (phosphate de magnésium et d'ammonium hexahydraté). Les calculs de struvite sont en fait un mélange composé de trois cations (calcium, magnésium, ammonium) et d'un anion (phosphate). Elle a été découverte dans certains environnements naturels particuliers associés à la décomposition de la matière organique, tels que les dépôts de guano, les grottes basaltiques et les marécages (Ben Omar et al, 2014; Sánchez-Román et al, 2007). Parallèlement, la struvite est un composant principal des calculs urinaires infectieux dans les corps humains et animaux, ce qui a suscité l'intérêt des scientifiques pour ce minéral (Doyle et al, 2012; Zhao et al, 2021)

La struvite cristallise en urine alcaline et forme des cristaux de grande taille pouvant se présenter sous différents faciès, en raison du processus cristallogène responsable de sa formation (Daudon et al, 2012).

Les premières études ont révélé que la formation de calculs de struvite était associée à une infection des voies urinaires causée par des bactéries productrices d'uréase telles que les espèces *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* (Nemoy et Stamey, 1971; Fowler, 1984), reconnaissant ainsi le lien entre l'activité bactérienne et la formation de struvite. Depuis lors, la minéralisation bactérienne de la struvite a fait l'objet d'une attention croissante.

## II.2. Mécanisme de la lithogénèse infectieuse

La pathophysiologie des calculs infectieux est bien connue et a été résumée comme suit par Healy et Ogan. (2007). L'uréase produite par les bactéries scinde l'urée urinaire en ammoniac et en dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). La poursuite de l'hydrolyse conduit à la production de deux ions ammonium et d'un ion bicarbonate pour chaque molécule d'urée, ce qui donne une urine très alcaline impossible à obtenir dans des conditions physiologiques normales. Le niveau élevé d'alcalinité urinaire favorise la sursaturation du phosphate d'ammonium de magnésium et du phosphate de calcium (apatite) (Fig 5).

La Carbapatite commence à cristalliser à un pH supérieur ou égal à 6,8 et la Struvite à un pH supérieur ou égal à 7,2. Le citrate a normalement un effet protecteur contre la formation de ces calculs en se complexant avec le calcium et le magnésium, mais les fortes concentrations de bactéries métabolisent le citrate et empêchent la formation de ces complexes. On trouve de la poussière de struvite et d'apatite autour des bactéries et la cristallisation peut se produire autour ou à l'intérieur des bactéries. Les cristaux d'apatite se développent dans les bactéries et après lyse des bactéries, les microlithes formés servent de noyau pour la formation des calculs.

Les cristaux qui se développent autour des bactéries vont s'y fixer et former un revêtement de phosphate. Les bactéries ainsi piégées dans le calcul seront à l'origine de récurrences infectieuses. La propagation des calculs est extrêmement rapide en raison de la production permanente des ingrédients de base pour leur formation et de la nature alcaline de l'urine qui rend l'apatite et la struvite peu solubles (Saussine *et al*, 2008).

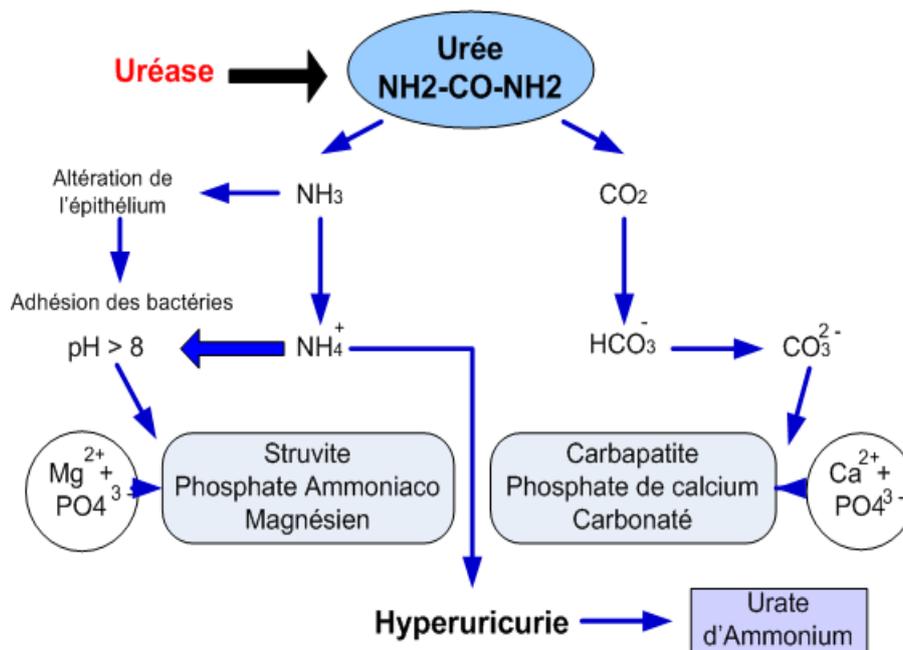


Figure 5 : Schéma de la lithogénèse infectieuse (Daudon, 2008)

### II.3. Calcul infecté et calcul d'infection

L'infection urinaire est un facteur de risque et de gravité de la lithogénèse infectieuse (Netelenbos *et al*, 2005; Kukreja *et al*, 2003) car; le calcul urinaire peut être préexistant ayant une origine métabolique secondairement surinfectés par des bactéries communes ou par des bactéries uréasiques dans ce cas on parle de calcul infecté (Bruyere *et al*, 2008).

On peut expliquer la présence de bactéries sur un calcul par le biofilm. Ce dernier est initié par un dépôt protéique à la surface du calcul propice à l'adhérence des bactéries. Ces bactéries forment ensuite une matrice polysaccharidique et deviennent ainsi difficilement accessibles aux antibiotiques (Sohshang *et al*, 2000). Par la suite, les bactéries, uréasiques ou non, entretiennent la lithogénèse, où les incrustations de struvite s'accumuleront (Hedelin, 2002). De plus, *Aspergillus fumigatus* peut également être associé à un calcul ou à un corps étranger urinaire.

L'infection urinaire peut également être secondaire à la formation d'un biofilm sur un corps étranger (sonde JJ) pouvant entretenir par la suite un processus de lithogénèse (Grases *et al*, 2001).

D'autre part l'infection urinaire peut être la principale cause de formation du calcul, dans ce cas on parle de calcul d'infection, (struvite par exemple), il est à savoir que ce dernier peut aussi être secondaire à un agent infectieux non urinaire (Daudon *et al*, 2012).

#### II.4. Micro-organismes uréolytiques

La formation de calculs de struvite est exclusivement associée à des bactéries qui produisent l'enzyme uréase, y compris des espèces Gram-positives et Gram-négatives appartenant à des genres tels que *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Providencia* et *Klebsiella*. Les principaux producteurs d'uréase sont présentés dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Microorganismes producteurs d'uréase (Daudon, 2012; Esen et Oktar Tayfun, 2010; Bhadra *et al*, 2005)

Organismes producteurs d'uréase	Habituellement (> 90% des isolats)	Occasionnellement (5-30% des isolats)
<b>Gram-négative</b>	<i>Bacteroides corrodens</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Brucella species</i> <i>Flavobacterium spp</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Morgenalla morganii</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus morganii</i> <i>Proteus rettgeri</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pasteurella species</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia ureilytica sp</i>
<b>Gram-positive</b>	<i>Corynebacterium hofmannii</i> <i>Corynebacterium ovis</i> <i>Corynebacterium renale</i> <i>Corynebacterium ulcerans</i> <i>Micrococcus varians</i>	<i>Bacillus species</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Corynebacterium equi</i> <i>Corynebacterium murium</i>

	<i>Flavobacterium species</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mycobacterium rhodochrous</i> group <i>Peptococcus</i> <i>asaccharolyticus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b>Mycoplasma</b>	<i>T-strain Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>	
<b>Yeasts</b>	<i>Cryptococcus</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Sporobolomyces</i> <i>Candida humicola</i> <i>Trichosporon cutaneum</i>	

Le nombre de souches productrices d'uréase au sein d'une espèce bactérienne peut être très variable, ces bactéries utilisent l'urée comme source d'azote (Rieu, 2005). Le groupe *Proteus* est la principale cause de la lithiase d'infection. Cependant, les infections à *Proteus* sont connues pour être persistantes et difficiles à traiter et peuvent conduire à plusieurs complications telles que la pyélonéphrite aiguë ou chronique (Cokeret *al*, 2000).

Une étude des isolats bactériens provenant de patients souffrant d'infections urinaires compliquées a montré que 100 % des *Proteus* spp, *Providencia* spp et *Morgenalla morgani* spp produisaient de l'uréase contre, seulement 84 % des *Klebsiella* spp et 55 % des *Staphylococcus* spp (Bichler *et al*, 2002). Ces bactéries sont principalement rencontrées en milieu nosocomial chez les patients souffrant de sondes urinaires à long terme (cathéters urinaires) ou chez les patients ayant des dérivations urinaires.

Les *staphylocoques* sont pour la plupart porteurs d'une uréase et ont une faible activité uréasique, ils sont rarement responsables de calculs de struvite (Rieu, 2005; Fowler, 1985). Bien qu'il s'agisse d'une cause majeure d'infection urinaire, on pense que seulement 1,4 % des *Escherichia coli* spp produisent de l'uréase et ne sont donc pas considérés comme une cause majeure de formation de calculs de struvite (Mariappan *et al*, 2006; Akagashi *al*, 2004).

*Ureaplasma urealyticum* a nécessairement besoin d'urée pour proliférer et peut exister à l'état commensal sur les muqueuses des hommes et des femmes (Deguchi *et al*, 2001). *Corynebacterium urealyticum*, ou *Corynebacterium* groupe D2 sont des bactéries commensales, ont une forte activité uréasique. Elles sont résistantes à de nombreux antibiotiques et peuvent infecter les urines de patients ayant subi des interventions urologiques et sous traitement antibiotique. Elles sont plutôt responsables de cystites incrustantes et de pyérites chez les sujets immunodéprimés (Meria *et Jungers*, 2000; 2008).

Ces données soulignent l'importance d'identifier les espèces productrices d'uréase en se basant sur la culture du calcul plutôt que sur la seule culture d'urine, car les bactéries cultivées à partir du calcul lui-même ne correspondent pas toujours à celles identifiées par la culture d'urine (Mariappan *et al*, 2006; Akagashi *et al*, 2004).

### **II.5. Les cristaux de la lithiase d'infection**

Les cristaux de struvite étant les plus courants (phosphate d'ammonium et de magnésium), peuvent apparaître chez des sujets en bonne santé, en particulier dans les urines alcalines. Ils sont souvent associés à des cristaux d'apatite (phosphate de calcium). En combinaison, ils sont connus sous le nom de triple phosphate. Comme déjà mentionné, ils ne sont précipités dans l'urine qu'en présence d'un pH urinaire élevé associé à une forte teneur en ammoniac. Cette condition ne se retrouve que dans le cas d'une infection des voies urinaires par des micro-organismes uérololytiques (Daudon, 2015).

Les cristaux de struvite sont des prismes incolores, qui prennent le plus souvent la forme de lingots d'or ou ressemblent au couvercle d'un cercueil (Fig 6), bien qu'en pratique d'autres formes atypiques de cristaux de struvite puissent être observées, comme la fougère (Rizzi *et al*, 2017; Katica *et al*, 2020).



**Figure 6 :** Cristaux de struvite entourés d'érythrocytes (500X) (Rizzi *et al*, 2017).

### **II.6. Traitement de lithiase d'infection**

Les calculs de struvite ont tendance à se développer rapidement, de sorte que tout fragment lithiasique présent peut servir de nid à la formation de nouveaux calculs. De ce fait, Le traitement optimal consiste en l'éradication complète du calcul, associée à une antibiothérapie (Flannigan *et al*, 2014).

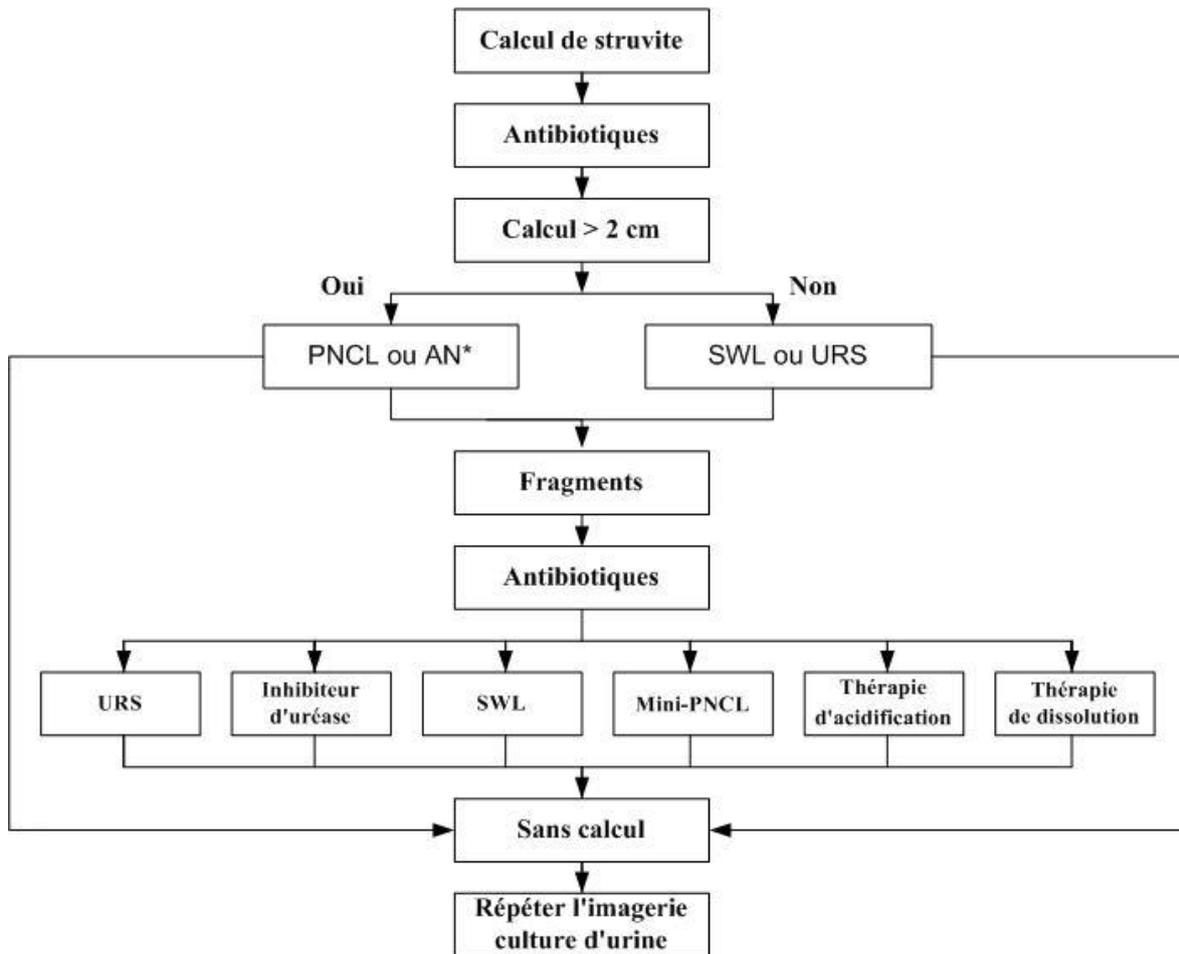
Les trois principes clés du traitement des calculs de struvite sont :

- ✓ L'élimination de tous les fragments de calculs;
- ✓ L'utilisation d'antibiotiques pour traiter l'infection;
- ✓ La prévention des récurrences.

Plusieurs méthodes d'élimination des fragments de calculs ont été décrites dans la littérature (Fig 7), notamment :

- ✓ L'utilisation d'inhibiteurs de l'uréase (tel que l'Acide acétohydroxamique (AHA) (Griffith *et al*, 1991);
- ✓ La thérapie d'acidification (La L-méthionine (Siener *et al*, 2016);
- ✓ La thérapie de dissolution (Dretler et Pfister, 1984);
- ✓ La lithotripsie extracorporelle par ondes de choc (SWL);
- ✓ L'urétéroscopie (URS);
- ✓ La néphrolithotomie percutanée (PCNL);
- ✓ La néphrolithotomie antrographique (AN) (Flannigan *et al*, 2014).

La PCNL est considérée comme l'approche de référence pour le traitement des calculs de struvite, mais des adjuvants peuvent être utilisés si nécessaire. Le suivi par imagerie et cultures urinaires périodiques après la chirurgie des calculs de struvite est recommandé entre 6 et 12 mois, bien que cela puisse être fait plus souvent entre 3 et 6 mois chez les patients qui ont montré des récurrences rapides ou fréquentes de calculs (Kelly *et al*, 2007).



**Figure 7 :** Proposition d'algorithme pour la prise en charge des calculs de struvite.

\*Les adjuvants à la PCNL peuvent inclure la mini-PCNL, la néphroscopie flexible et l'URS rétrograde (Flannigan *et al*, 2014).

En présence d'un calcul de struvite, des antibiotiques doivent être utilisés avant la chirurgie. Si le patient n'est pas un candidat à la chirurgie, la SWL peut être envisagée (si elle est réalisable) ; sinon, la PCNL, la méthode de référence, doit être utilisée. Dans les rares cas où la PCNL n'est pas possible en raison d'anomalies anatomiques, l'AN doit être envisagée.

En présence de fragments, des antibiotiques doivent être envisagés après l'intervention (Zanetti, *et al*, 2008). Ces fragments peuvent être traités avec plusieurs modalités différentes ; l'URS, la SWL, la PCNL répétée et la mini-PCNL sont les plus couramment utilisés pour obtenir l'élimination des calculs. Une imagerie répétée et des cultures d'urine doivent être effectuées en postopératoire (Flannigan *et al*, 2014).

## II.7. la phytothérapie et lithiase urinaire

Malgré les progrès des sciences pharmacologiques, la mémoire de la médecine traditionnelle survit encore et elle reste comme un patrimoine commun à utiliser en cas de besoin (Tiță et al, 2009). La médication traditionnelle est une source essentielle de composés potentiellement précieux pour le développement d'agents thérapeutiques potentiels (Palombo et Semple, 2001). Un large éventail d'extraits de plantes médicinales sont utilisés comme des médicaments bruts (Uniyal et al, 2006) et sont connus pour être une source essentielle de composés anti-infectieux avec des effets potentiels de guérison (Acharya et Shrivastava, 2008). En outre, cela a conduit à l'invention d'un nouveau médicament contre diverses maladies pour l'être humain en raison de la sécurité et l'efficacité (Anand et al, 2014). Selon les informations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), pas moins de 80% de la population mondiale s'attendent à leurs soins de santé primaires (Igoli et al, 2003) parce qu'elle est fiable, simple, non toxique, facile, disponible, respectueux de l'environnement et faible effet indésirable, ce qui améliore son acceptabilité pour les personnes consommatrices (Mukul et al, 2007; Asadbeigi et al, 2014; Bahmani et al, 2016). De plus, les effets thérapeutiques des plantes médicinales sur les troubles des reins et des voies urinaires ont été étudiés à plusieurs reprises et leur efficacité a été démontrée (Gupta et Chaphalkar, 2016).

La struvite représente 10 à 20 % du deuxième composant cristallin prédominant, qui se développe rapidement et peut constituer un trouble effrayant à vie, surtout chez les femmes (Chauhan et al, 2009; Bindhu et al, 2015). Elle se forme principalement lorsque les voies urinaires sont infectées par des micro-organismes positifs à l'uréase, notamment *Proteus* qui est la principale bactérie ségrégative à l'uréase chez l'homme (Bichler et al, 2002; Sujoy, 2013).

Le calcul de struvite ne présente aucune indication comme les autres calculs, une infection fréquente peut être un symptôme de calcul de struvite, une douleur légère et du sang dans l'urine peuvent être observés. De plus, l'infection chronique peut provoquer des lésions rénales importantes et, si elle n'est pas traitée, elle peut conduire à une insuffisance rénale terminale (Vupputuri et al, 2004). L'infection peut donc être traitée par des antibiotiques, mais elle devient de plus en plus résistante aux antibiotiques (Rawat et al, 2015) et il est nécessaire d'étudier différents composés ayant des propriétés antimicrobiennes. Dans le système traditionnel de nombreuses plantes sont utilisées pour le traitement de diverses maladies, mais il n'y a pas d'études pharmacologiques et cliniques bien établies pour mettre en évidence leur efficacité. Cependant, plusieurs plantes sont efficaces pour guérir et prévenir la répétition des calculs rénaux sans effets secondaires.

### II.7.1. Description botanique de l'espèce végétale étudié « *Fraxinus excelsior* »

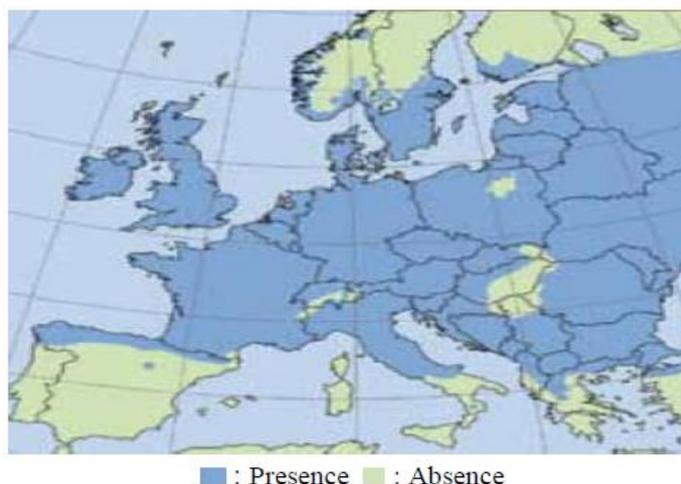
*Fraxinus excelsior* L est une espèce de *Fraxinus*, appartenant à la famille des oléacées, communément appelé « frêne » ou « frêne européen » (Mahboubi et al, 2019), connue localement sous le nom de « Dardar » qui est, au fait, un arbre à feuilles pennées, atteignant généralement 30 m de hauteur (Rigling et al, 2016). La couronne est bombée et ouverte avec branches ascendantes. Les arbres possèdent une écorce lisse, de couleur « gris pâle », qui s'épaissit et développe des fissures au cours du temps. Ses feuilles sont opposées, de 20 à 36 cm de long, comportant 9 à 13 folioles fines acuminées de 5 à 12 cm de long et de 2 à 3 cm de large, non pétiolées, à la base en coin asymétrique, à l'exception de la foliole terminale, pétiolée à la base en coin symétrique ; elles sont vert mat en dessus, plus clair en dessous. Les rameaux sont d'une couleur brun verdâtre, aplatis à l'extrémité et derrière les bourgeons ronds et noirs. Le fruit, atteignant 3,5 cm au total, est composé de plusieurs samares simples disposées en vrille, aux ailes tronquées parallèles. Les Fleurs sont vertes et pourpres sans pétales s'épanouissant en mars issues de boutons latéraux à la base des rameaux de l'année précédente (Rushfort, 2000).



Figure 8 : feuille de *Fraxinus excelsior* L. (Flanagan et al, 2013).

### II.7.2. Répartition géographique

Elle pousse dans les régions tempérées comme elle est originaire de l'Europe, de l'Asie occidentale et de l'Afrique du Nord. En Algérie, elle présente des distributions géographiques très étendues et différentes au Nord et des hauts plateaux. Néanmoins, on la trouve principalement en Kabylie (Pliûra et al, 2003; Maghrani et al, 2004; Eddouks et al, 2005).



**Figure 9** : Distribution de *Fraxinus excelsior* en Europe et Afrique du Nord selon EUROFORGEN (2009).

### II.7.3. Composition chimique et activités biologiques

Les constituants chimiques de la plante *F excelsior* comprennent des benzoquinones, des coumarines, des flavonoïdes, des phényléthanoïdes, des glucosides sécoiridoïdes, des dérivés indoliques et des composés phénoliques simples (Mahboubi et al, 2019; Kostova et Iossifova, 2007); elle est donc considérée comme une plante aux activités biologiques et pharmacologiques polyvalentes (Kostova et Iossifova, 2007; Visen et al, 2009; Amamra et al, 2018). Son immense éventail de propriétés pharmacothérapeutiques a été bien documenté notamment pour ses effets diurétique (Tita et al, 2009; Kostova et Iossifova, 2007), anti-inflammatoire et antirheumatic (Bai et al, 2013), antioxydant (Middleton et al, 2005; Visen et al, 2009), anti-rhumatismales (Gundermann et Müller, 2007), antibactérienne (Middleton et al, 2010), analgésique (Flanagan et al, 2018) antipyrétique (Visen et al, 2009), hypoglycémique (Eddouks et al, 2004; Maghrani et al, 2004; Ibarra et al, 2011), antihypertensive (Eddouks et al, 2005; López-Carreras et al, 2013), broyeur de calculs biliaires (Parsa, 1959) comme elle est citée pour son effet litholytique (Eddouks et al, 2004). De même, *F excelsior* est l'une des principales plantes fourragères en Algérie (Chouaki, 2006).

# ***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 diagnostic étiologique de la pathologie lithiasique passe inéluctablement par l'analyse du calcul de l'arbre urinaire. Ce dernier contient dans sa composition les informations de la sursaturation urinaire responsables de sa formation mais également les anomalies de la composition des urines aussi bien permanents que transitoires ou intermittents. Le calcul est, de ce fait, témoin des conditions de sa lithogénèse. Cette dernière, qui est souvent à caractère multifactoriel, est le résultat d'un déséquilibre entre inhibiteurs et promoteurs de la cristallisation urinaire. Les informations soutirées de l'analyse du calcul doivent être par conséquent aussi bien complètes que précises. Pour cette fin, on préconise une approche d'analyses morphologique et constitutionnelle (morpho-constitutionnelle) basées sur des techniques physiques fiables et complémentaires dont les microscopies optique et électronique à balayage pour les aspects morphologiques et la spectroscopie infrarouge pour l'analyse qualitative, semi-quantitative et quantitative des calculs urinaires. Les résultats de ces analyses seront utilisés pour la détermination des principales étiologies spécifiques à chaque calcul analysé.

Dans cette étude on objective, à partir de l'analyse morpho-constitutionnelle d'une cohorte de lithiase de l'arbre urinaire collectée au niveau de la région Est Algérien, de dégager une étude épidémiologique de la lithiase urinaire et au-delà orienter cette étude sur la lithiase d'origine infectieuse au niveau de cette région.

### I.2. Matériels et méthodes

#### I.2.1. Lithiase de l'arbre urinaire

La présente étude s'est portée sur une cohorte de 1553 lithiases de l'arbre urinaire de la région Est-Algérien. La collecte des calculs urinaires s'est effectuée principalement dans des structures hospitalo-universitaires et principalement au niveau du service d'urologie du CHU Annaba et l'Etablissement Hospitalier Spécialisé (E.H.S) Nephro-urologique de Constantine. Ces deux structures ont une grande couverture hospitalière de la région Est Algérien. Cependant, la contribution d'autres structures hospitalières publiques et privées (au niveau cette région) n'a pas été des moindres ce qui nous a permis d'assurer une couverture conséquente de cette région touchant également une bonne partie de la région du Sud-Est-Algérien (El Oued, Ouargla).

Chaque cas de lithiase est accompagné d'une fiche d'informations préliminaires sur le patient (sexe, âge, antécédents lithiasiques, antécédents familiaux, etc...) et du calcul (localisation, mode d'élimination, etc...) renseignée 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).

### ***1.2.2. Analyse des calculs***

L'ensemble du matériel et accessoires utilisés dans l'étude morphologique et constitutionnelle des calculs sont illustrés dans la figure 10. L'analyse des calculs par approche morpho constitutionnelle consiste à associer les données collectées par l'observation microscopique, effectuée par loupe binoculaire, avec celles de l'analyse spectrophotométrique réalisée à l'aide d'un Spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier. Dans certains cas les observations microscopiques ont été renforcées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et l'analyse constitutionnelle (Figure 11).

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 (FTIR) a été réalisée au niveau de l'unité de recherche des transformations de phases de l'Université de Constantine. Le microscope électronique à balayage (MEB) utilisé est de type Zeiss SUPRA55VP/Gemini implanté à Orsay (Université Paris sud France)

Une fois récupérés, les calculs sont nettoyés, séchés à l'air libre avant leur examen morphologique. Il s'en suit après leur analyse spectrophotométrique infrarouge sélective du noyau jusqu'aux couches externes (qualitative et semi-quantitative) et une finale sur l'ensemble du calcul (quantitative).

#### ***1.2.2.1. Examen morphologique***

L'examen morphologique a été réalisé par une loupe binoculaire (OLYMPUS SZ 61) 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 M. Daudon.



**Figure 10:** Matériel et accessoires utilisés dans les analyses morphologiques et infrarouge des calculs urinaires

Au cours de cette phase d'observation et après la prise des photos des calculs, on a sélectionné les différentes zones d'intérêt pour un prélèvement spécifique qui sera destiné à une

analyse par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. Dans la plupart des cas 4 prélèvements (surface, section, noyau et poudre globale) ont suffi pour l'étude spectrale. Ces prélèvements ont été réalisés par un scalpel.



**Figure 11:** Microscope électronique à balayage (MEB) utilisé pour l'observation des lithiases à l'échelle mésoscopique (200nm à 200µm)

#### *1.2.2.2. Analyse Infrarouge*

Cette analyse consiste à identifier la composition moléculaire et cristalline (voir amorphe et/ou huileuse, protéique etc..) des différentes zones du calcul.

Un échantillon représentatif de chaque zone (surface, section, noyau) est 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. La poudre ainsi obtenue est introduite dans le moule à pastiller (Pastilleuse = Presse hydraulique "International Cristal Laboratory") et soumise à l'action d'une pression de 10 tonnes/cm<sup>2</sup> 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'onde comprises entre 400 et 4000 cm<sup>-1</sup> et l'interprétation de ces derniers a été faite par comparaison à des spectres de références (Annexe 2).

Les données de l'analyse morpho-constitutionnelle de chaque calcul font l'objet d'un compte-rendu regroupant des informations collectées sur ses caractères organoleptiques, de son typage

morphologique ainsi que les résultats de son analyse par spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (Annexe 3).

### ***1.2.2.3. Analyses Statistiques***

Les données ont été saisies dans une base de données Excel. Après codage, elles ont été traitées à l'aide du logiciel SPSS version 10. La méthodologie de l'analyse statistique des données a été basée sur deux axes :

- Statistique descriptive : dégagement des fréquences et des caractéristiques de chaque paramètre étudié.
- Statistique analytique : basée sur des tests d'association : test de Khi2 qui mesure l'écart entre les fréquences observées et les fréquences théoriques. Nous avons utilisé ce test pour comparer entre les deux sexes pour les paramètres étudiés.

Nous avons utilisé également l'analyse de variance à un facteur (ANOVA), qui estime la variation intergroupe par rapport à la variation intragroupe (rapport F) entre les moyennes pour les différents paramètres étudiés. Les résultats sont considérés significatifs lorsque p est inférieur à 0,05. Pour identifier les groupes dont les moyennes sont différentes, nous avons utilisé le test post hoc qui est un test de comparaison multiple.

## **I.3. Examen morphologique**

L'examen morphologique du calcul urinaire et sa classification en type(s) et sous type(s) selon [Daudon et al. \(2012\)](#) est une étape préliminaire d'importance majeure. En effet, un même composant lithiasique peut se mettre sous différentes morphologies selon les facteurs biochimiques impliqués dans le processus de sa lithogénèse. De ce fait, le typage morphologique du calcul oriente vers ses principales causes lithogènes (Tableau 4). Ce qui permet finalement de délimiter le champ d'investigation clinique et une prise en charge thérapeutique qui repose sur des orientations bien éclairées.

Cet examen s'introduit comme la première action à entreprendre dans l'analyse des calculs de l'arbre urinaire. Il consiste à observer la structure des calculs de l'échelle macroscopique à l'échelle microscopique (voir aussi mésoscopique) pour déterminer leurs caractéristiques organoleptiques et structurales aussi bien en surface qu'en section.

En outre, l'identification puis l'observation de la partie centrale du calcul présente un intérêt particulier pour dégager les conditions initiales de sa nucléation. L'hétérogénéité avec laquelle se présente la majorité des calculs de l'arbre urinaire, témoigne de la diversité des causes

impliquées dans sa confection. En outre, la première cause de nucléation du calcul est souvent différente de(s) la cause(s) responsable(s) de sa croissance.

Pour ce qui est de la lithiase d'infection deux situations peuvent se présenter :

- Lithiase initiée par une infection à germes uréasiques ou non uréasiques. Dans ce cas c'est le typage morphologique et la composition de la partie centrale du calcul (noyau) qui seront révélateur de son origine infectieuse.
- Lithiase d'origine non infectieuse et où l'infection se manifeste lors de la croissance du calcul. Dans ce cas le typage morphologique et la composition du noyau ne présentent aucun indice d'infection contrairement au reste du calcul (section et/ou surface).

Dans cette étude la classification des calculs d'infection a été effectuée à partir du typage morphologique et la composition des calculs.

**Tableau 4 :** Les principaux facteurs lithiasiques favorisants dégagés de l'approche morphoconstitutionnelle

Morphologie	Composition	Particularité	Facteurs favorisants
<b>Ia</b>	Whewellite (C1) : lithiase de structure oxalo-dépendante	Plaque de Randall	. Hyperoxalurie de débit ou de concentration . Maladie de Cacchi-Ricci . Alimentation riche en oxalate et en protéines animales . Diurèse insuffisante . Nucléation hétérogène sur plaque de Randall au niveau de la papille rénale
<b>Ib</b>	Whewellite		. Hyperoxalurie de débit ou de concentration . Alimentation riche en oxalate et en protéines animales . Stase par anomalie urologique . Diurèse insuffisante
<b>IC</b>	Whewellite		Oxalose, hyperoxalurie primaire
<b>Id</b>	Whewellite		. Hyperoxalurie de débit ou de concentration . Alimentation riche en oxalate et en protéines animales . Diurèse insuffisante . Stase, lithiases multiples, confinement anatomique, anomalie urologique
<b>I actif</b>	Whewellite		Syndromes de malabsorption (maladie de Crohn, maladie coeliaque...)
<b>IIa</b>	Weddelite (C2) : lithiase de structure calcium-dépendante		Hypercalciurie quelle qu'en soit l'origine
<b>IIb</b>	C1 + C2 Par perte d'H <sub>2</sub> O ou cristallisation mixte		. Hypercalciurie associée à une hyperoxalurie modérée ou intermittente . Stase urinaire . Alimentation riche en protéines animales, produits laitiers ou oxalate . Diurèse insuffisante
<b>II c</b>	Weddelite (C2)		. Hypercalciurie . Stase, confinement anatomique

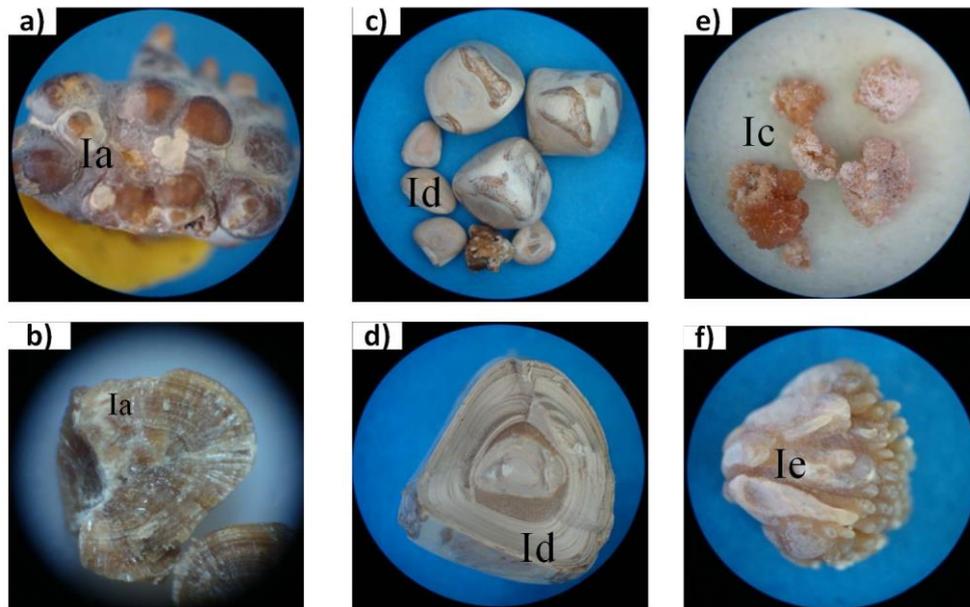
<b>III a</b>	Acide urique anhydre (AU0) : lithiase de structure urico-dépendante		<ul style="list-style-type: none"> <li>. pH urinaire acide</li> <li>. Hyperuricurie intermittente</li> <li>. Stase</li> </ul>
<b>III b</b>	Acide urique dihydraté (AU2) +/- acide anhydre (AU0)	Si lithiase vésicale : lithiase urique de stase	<ul style="list-style-type: none"> <li>. pH urinaire acide</li> <li>. Hyperuricurie +/- hyperuricémie</li> <li>. Diathèse goutteuse</li> <li>. Consommation d'aliments riches en purines</li> <li>. défaut d'ammoniogenèse rénale</li> <li>. Candidose urinaire</li> <li>. Troubles hydro électrolytiques</li> </ul>
<b>III c</b>	Urates divers		Hyperuricurie avec alcalinisation des urines soit thérapeutique, soit d'origine infectieuse
<b>III d</b>	Urate acide d'ammonium		<ul style="list-style-type: none"> <li>. Hyperammoniogénèse rénale ou urinaire</li> <li>. Infection urinaire à germes ammoniogènes</li> <li>. Malnutrition</li> <li>. Anorexie mentale</li> <li>. Perte de bases digestives (diarrhées infectieuses, abus de laxatifs)</li> </ul>
		Enfant de 0 à 3 ans	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Hyperammoniogénèse rénale ou urinaire</li> <li>. Infection urinaire à germes ammoniogènes</li> <li>. Malnutrition</li> <li>. Perte de bases digestives (diarrhées infectieuses)</li> </ul>
<b>IV a 1</b>	Carbapatite (CA) +/- oxalate : lithiase de structure phosphatique	Sans struvite	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Infection urinaire à germes non uréasiques</li> <li>. Hypercalciurie</li> <li>. Diabète phosphaté</li> <li>. Trouble de l'acidification tubulaire</li> <li>. Hyperparathyroïdie primaire</li> </ul>
<b>IV a 2</b>	Carbapatite		<ul style="list-style-type: none"> <li>. Acidose tubulaire congénitale ou acquise (syndrome de Gougerot-Sjögren, acidose d'Albright, infections urinaires chroniques parenchymateuses, hépatites chroniques actives ...)</li> <li>. Trouble focal de l'acidification rénale (maladie de Cacchi-Ricci)</li> </ul>
<b>IV b</b>	Carbapatite	Sans struvite	Hyperparathyroïdie primaire
	Carbapatite	Avec struvite	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Hyperparathyroïdie primaire</li> <li>. Infection urinaire chronique à germes uréasiques</li> </ul>
<b>IV c</b>	Struvite (PAM)		<ul style="list-style-type: none"> <li>. Infection de l'arbre urinaire par des germes uréasiques</li> <li>. Diurèse insuffisante</li> </ul>
		Animal	Infection urinaire à germes uréasiques
<b>IV d</b>	Brushite		<ul style="list-style-type: none"> <li>. Hyperparathyroïdie primaire</li> <li>. Hypercalciurie</li> <li>. Diabète phosphaté</li> <li>. Anomalie urologique</li> <li>. Sarcoidose</li> </ul>
<b>V</b>	Cystine		Cystinurie - Lysinurie
<b>VI a</b>	Protéines		Pyélonéphrites chroniques

### ***I.3.1. Observations à la loupe binoculaire***

Ces observations ont été effectuées pour l'ensemble des calculs de notre série. A ce niveau, la classification de [Daudon et al. \(2012\)](#) nous a permis de faire une répartition de la majorité de nos calculs selon leur typage (et sous typage) morphologique correspondant. Cette classification a également eu le mérite de faire distinguer les lithiases urinaires des lithiases factices (origine non urinaire) dont la proportion avoisine 1%. Ces observations nous ont permis également de constater, pour l'ensemble de nos calculs, que l'aspect hétérogène, où plus de 2 typages morphologiques coexistent dans un même calcul, prédomine à plus de 60%. Dans ce qui suit nous allons présenter certains aspects d'ordre morphologique observés dans notre série.

#### **➤ *Morphologies de l'oxalate de calcium***

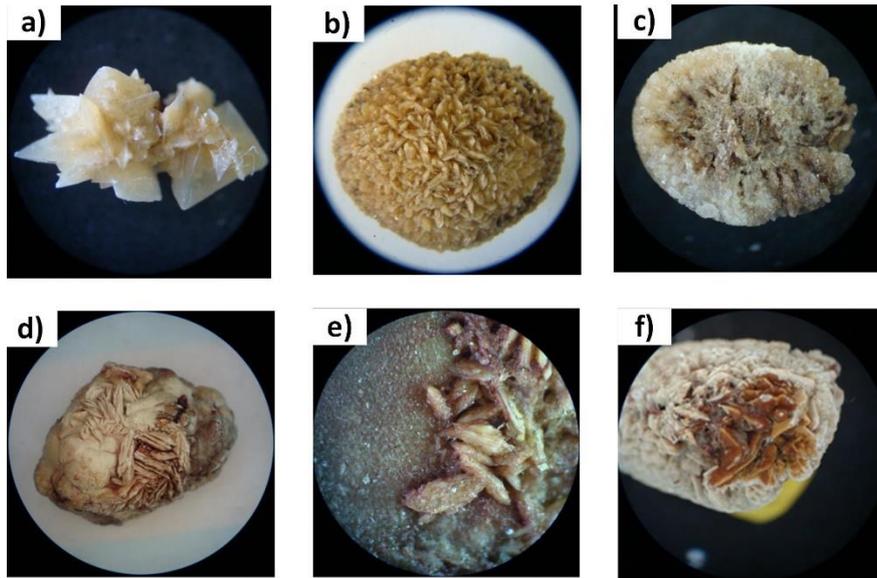
Dans les calculs urinaires l'oxalate de calcium se forme selon trois phases distinctes, L'oxalate de calcium monohydraté (COM  $\equiv$  C1) ou Whewellite, l'oxalate de calcium dihydraté (COD  $\equiv$  C2) ou Weddellite et l'oxalate de calcium trihydraté (COT  $\equiv$  C3) ou Caoxite. Cette dernière est moins présente dans les calculs rénaux du fait de sa métastabilité (phase thermodynamiquement très instable de structure triclinique). Cliniquement le COT ne présente pas un intérêt particulier dans le diagnostic médical bien qu'en termes de cristallites, la présence de cristaux de Caoxite dans les urines du réveil peut être observée en présence de différents faciès cristallins de Whewellite en cas d'hyperoxalurie primaire. Pour ce qui de la forme monohydraté (Whewellite ou C1) elle constitue la phase la plus thermodynamiquement stable qui se cristallise selon le système cristallin monoclinique. De par sa stabilité et sa faible limite de solubilité, la Whewellite présente également la phase la plus répandue. Sa formation s'effectue en conditions d'hyperoxalurie. Dans les figures 12 sont représentées quelques morphologies de l'oxalate de calcium monohydraté formés suite à des pathologies d'hyperoxalurie particulières.



**Figure 12 :** Micrographies de Whewellite sous différents typages morphologiques obtenus dans des contextes pathologiques différents :

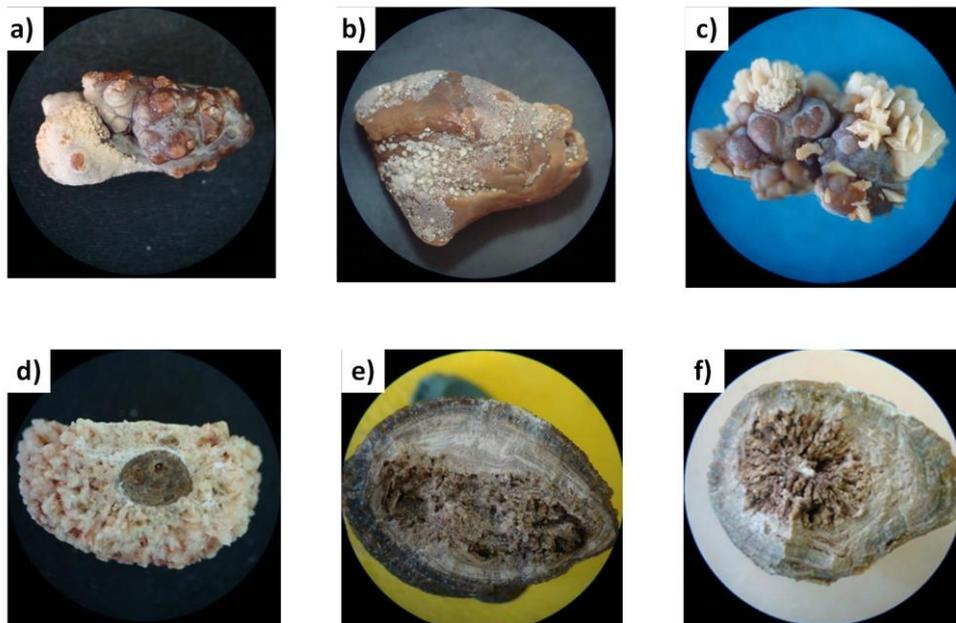
- Hyperoxalurie de débit ou de concentration (a) surface et (b) section
- Stase par anomalie urologique type syndrome de jonction (c) surface et (d) section
- Hyperoxalurie primaire (Lithiase congénitale) (e)
- Hyperoxalurie entérique (f)

La Weddellite, seconde phase d'oxalate de calcium se forme dans des conditions d'hypercalciurie. Bien qu'elle soit une phase métastable le COD se forme avec des proportions significatives dans les calculs rénaux. Son système cristallin tétragonal lui procure une forme spécifique en spicules caractéristiques qui apparaissent généralement en surface. Dans le cas d'un environnement urinaire d'hypocitraturie (ou ayant un déficit en inhibiteur de cristallisation) la dimension des spicules peut dépasser les 3 mm. Les figures 13 illustrent quelques exemples des morphologies du COD. L'instabilité de la weddellite (COD) se manifeste sur sa morphologie par la conversion cristalline COD vers COM dans laquelle les spicules de Weddellite perdent progressivement leur forme quadratique de sorte que les spicules initiales s'effacent (spicules émoussées) et deviennent généralement plus foncées. Dans ce dernier cas, le calcul peut être majoritaire en C1 mais sa morphologie de spicule émoussée renseigne sur son origine hypercalciurique avec la formation initiale de C2.



**Figures 13 :** Micrographies de Weddellite mettant en évidence une surface en spicules quadratiques (a et b) et une structure radiale en section (c) avec des exemples de la conversion cristalline COD vers COM (d, e et f)

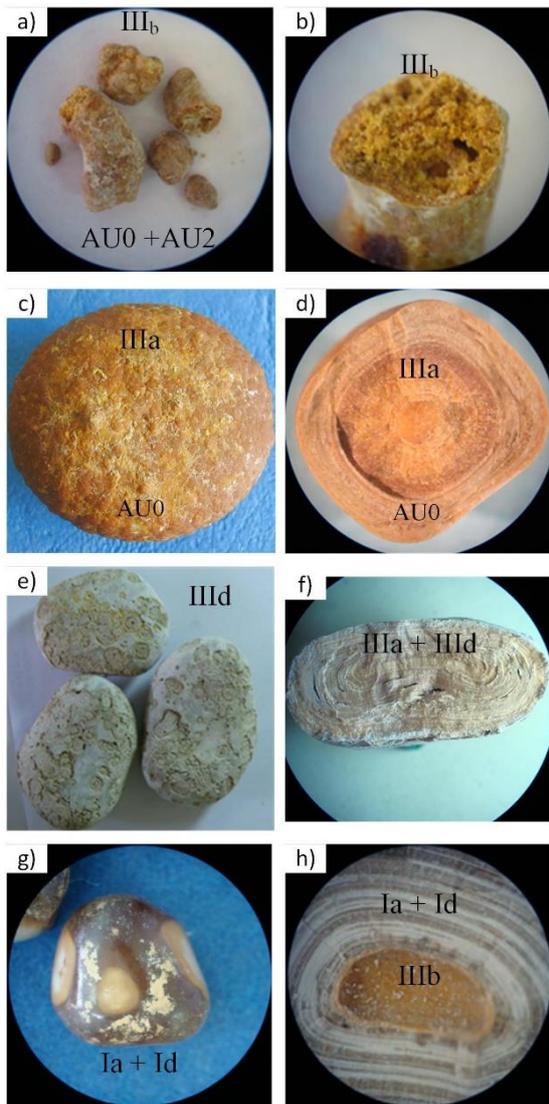
L'association Whewellite-Weddellite est assez fréquente dans les calculs urinaires. Dans ce cas, la formation de des deux composant peut-être aussi bien initiale qu'intermittente. La partie centrale du calcul (Noyau) renseigne généralement sur la cause de sa nucléation et le reste (Section et Surface) sur les causes supplémentaires associées ou intermittentes (Fig 14)



**Figure 14 :** Micrographies mettant en évidence l'association en surface des composants oxalo-calciques COM et COD (a, b et c) et au niveau de section (d, e et f)

➤ ***Morphologies de la lithiase urique et purique***

La lithiase urique est formée essentiellement de deux composants lithiasiques à savoir l'acide urique anhydre, qui est la phase la plus thermodynamiquement stable, et l'acide urique dihydraté (moins stable). Morphologiquement, ces composants se forment selon les sous-types IIIa et IIIb. L'acide urique, qui est le produit terminal de la dégradation des purines, possède une faible solubilité et se forme particulièrement en milieu acide (faible pH). Le contexte de sa formation est, de ce fait, lié à une Hyperuricurie, associée ou non à une Hyperuricémie. Dans ce cas, les orientations étiologiques sont focalisées sur l'excès d'excrétion rénale de l'acide urique qu'il soit inné du métabolisme ou dû à une maladie secondairement acquise. Les facteurs, âge, apport hydrique faible, consommations excessives d'aliments riches en purines dont les protéines animales (viandes et abats ....) favorisent considérablement la formation de tels calculs. La localisation de la lithiase urique au niveau l'arbre urinaire peut également être révélatrice de son origine. Dans ce cas, la lithiase urique vésicale est généralement formée dans un contexte de stase induit par adénome prostatique. Celle rénale, est beaucoup plus liée à un défaut d'ammoniogenèse. Dans les figures 15 on donne des exemples de lithiases uriques qui illustrent ces différents aspects.



**Figures 15 :** Micrographies relatives à des lithiases d'acide urique formé dans différents contextes :

- (a, b) Hyperacidité urinaire avec une morphologie IIIb en surface et en section
- (c, d) Stase dans un contexte d'adénome prostatique avec un typage IIIa en surface et en section
- (e, f) Association d'AU0 et d'UrAm dans un contexte d'Hyperuricurie associée à une Hyperuricémie
- (g, h) Initiation du calcul par hyperacidité urinaire et croissance par hyperoxalurie et consommation excessive de protéines animales

L'association de l'acide urique avec d'autres composants lithiasiques est assez fréquente notamment avec l'urate acide d'ammonium et l'oxalate de calcium monohydraté (Fig15 e-h). Dans le premier cas l'hyperuricurie est associée avec l'hyperuricémie et dans le deuxième cas on évoque souvent l'hyperacidité urinaire associée avec une hyperoxalurie et une consommation excessive de protéines animales.

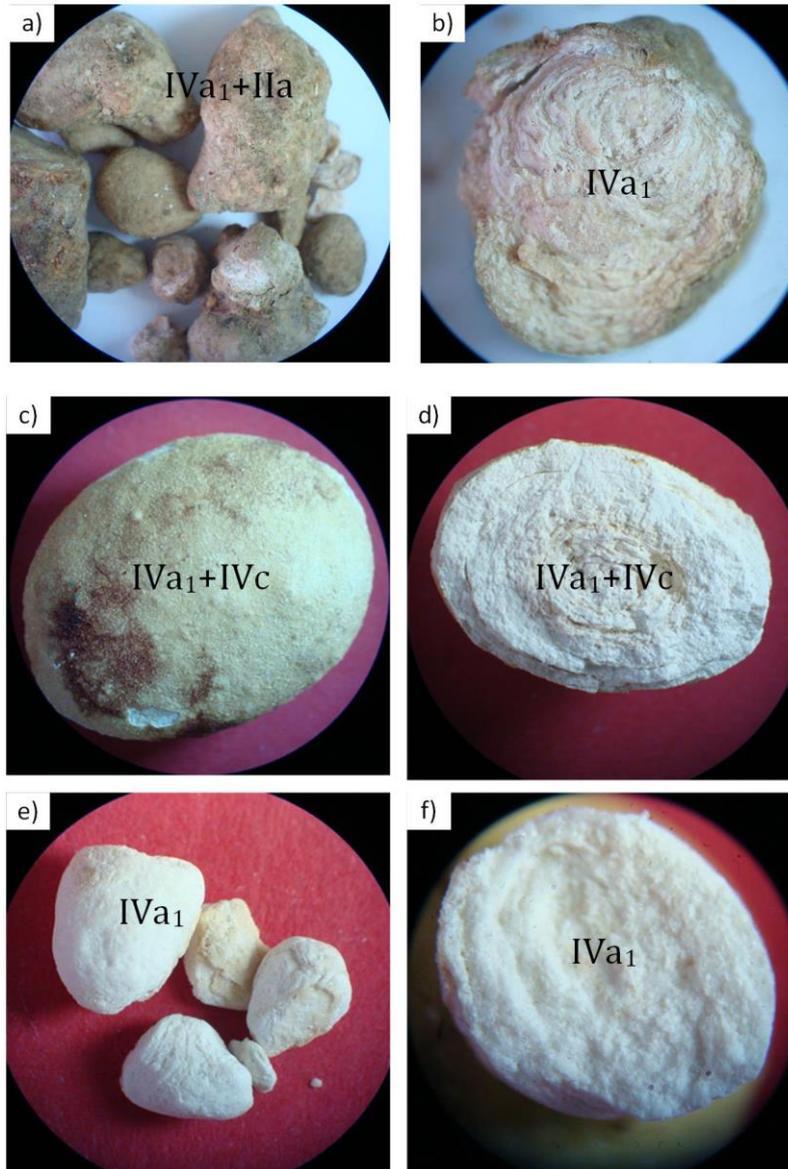
#### ➤ *Morphologie de la lithiase phosphocalcique*

Les composants de ce type de lithiase appartiennent à la famille des phosphates calciques qui se cristallisent, pour la plupart, en système hexagonal. Selon le pH urinaire, on note, pour ces composants, une facilité de conversions cristallines vers des phases plus stables à partir d'autres qui le sont moins. Dans les urines on peut observer la formation d'une panoplie de phosphates calciques dont le phosphate amorphe de calcium carbonaté, l'hydroxyapatite, la

whitlockite, la brushite, le phosphate tricalcique, le phosphate octocalcique et la carbapatite (carbonate-apatite). La formation de ces composants est cependant amoindrie en milieu acide et le domaine de leur précipitation est généralement supérieur à un pH=6. Dans les urines, à pH > 6,5 avec un produit molaire important, se précipite en premier le phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) qui évolue spontanément en carbonate apatite (Carbapatite : CA) ou en brushite. Cette dernière semble cependant plus stable en milieu légèrement acide (de 6 à 6,5). De ce fait, le PACC et les carbonates apatites (CA) sont de loin les composants phosphocalciques les plus usuelles dans la lithiase rénale phosphocalcique. Le contexte de formation de ce type de lithiase est très variable bien qu'il se focalise généralement dans l'hypercalciurie-hyperphosphaturie, l'infection urinaire à germes uréasiques ou non uréasiques, diabète phosphoré, hyperparathyroïdie primaire. Dans les figures 16 sont illustrés des micrographies de la morphologie du sous type IVa1 (majoritaire), et dont la carbapatite est le composant prédominant, orientant vers diverses étiologies dont : une hypercalciurie avec un trouble mineur de l'acidification inné ou acquis (infection parenchymateuse, médicaments inhibiteurs de l'anhydrase carbonique) (Fig : 16 a et b), une infection urinaire à germes uréasiques (Fig : 16 c et d) et une infection urinaire à germes non uréasiques (Fig : 16 e et f).

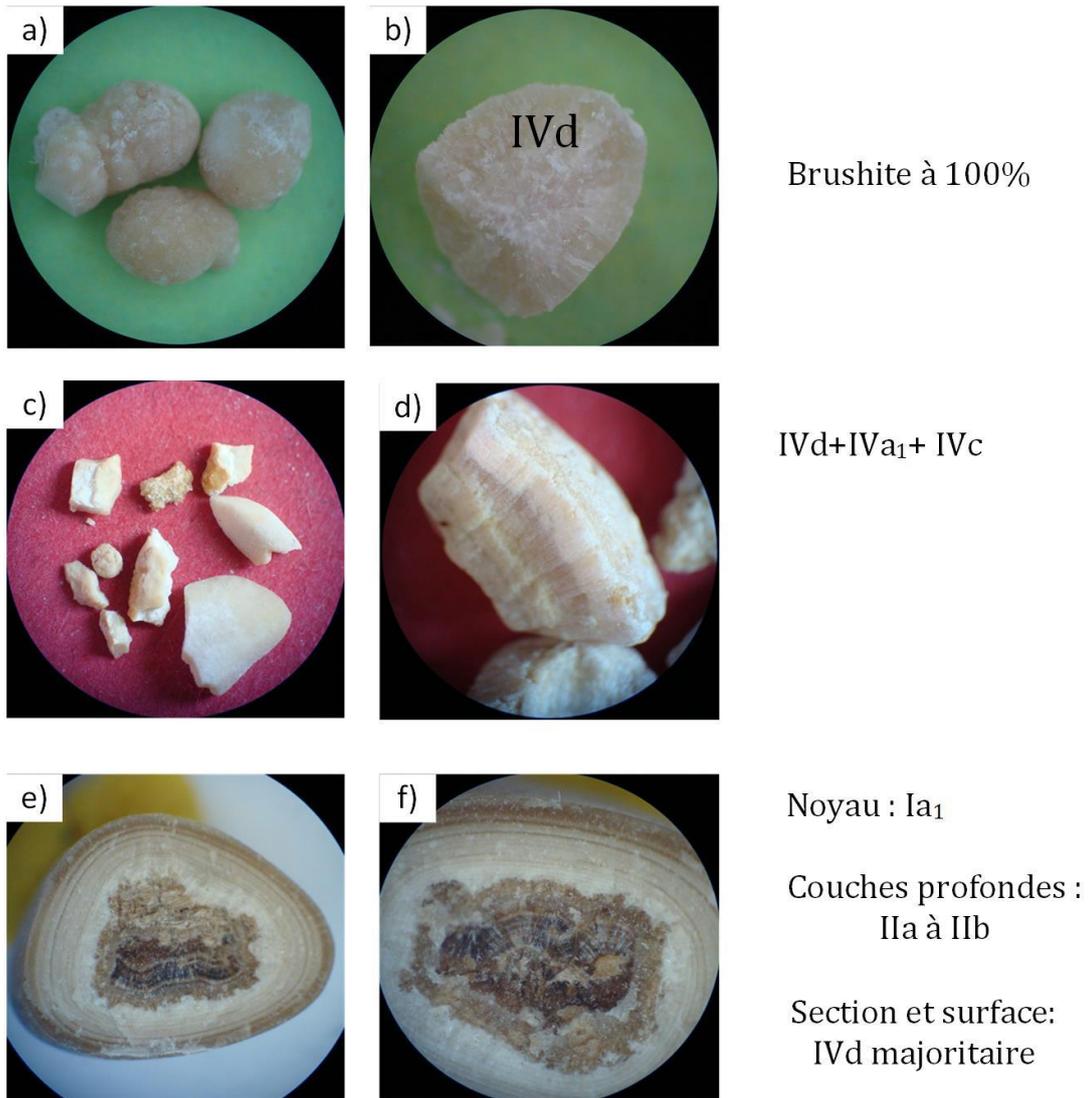
La brushite, quant à elle, se cristallise sous le sous type IVd comme elle se forme également dans des contextes étiologiques différents dont l'hyperparathyroïdie primaire (Fig : 17 a et b), l'infection urinaire à germes uréasiques (Fig : 17 c et d) et l'hypercalciurie (Fig : 17 e et f).

Dans les figures 18 sont illustrées la carbapatite sous une morphologie IVa2, orientant vers une étiologie spécifique qui est l'acidose tubulaire distale (Fig : 18 a et b), et lithiase d'infection associant la whitlockite sous IVa1 avec les protéines sous VIb (Fig : 18 c et d)



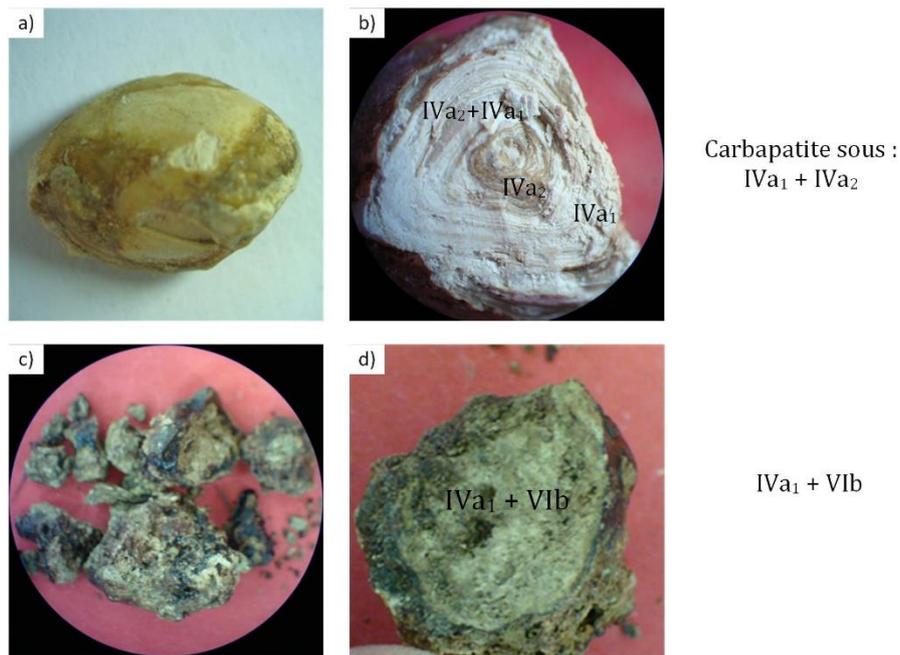
**Figure 16** : Lithiases de carbapatite (composant prédominant) de morphologie IVa<sub>1</sub> majoritaire orientant vers diverses étiologies

- Hypercalciurie avec un trouble mineur de l'acidification inné ou acquis (a) et (b)
- Infection urinaire à germes uréasiques (c) et (d)
- Infection urinaire à germes non uréasiques (e) et (f)



**Figure 17** : Lithiases de brushite (composant prédominant) de morphologie IVd orientant vers diverses étiologies

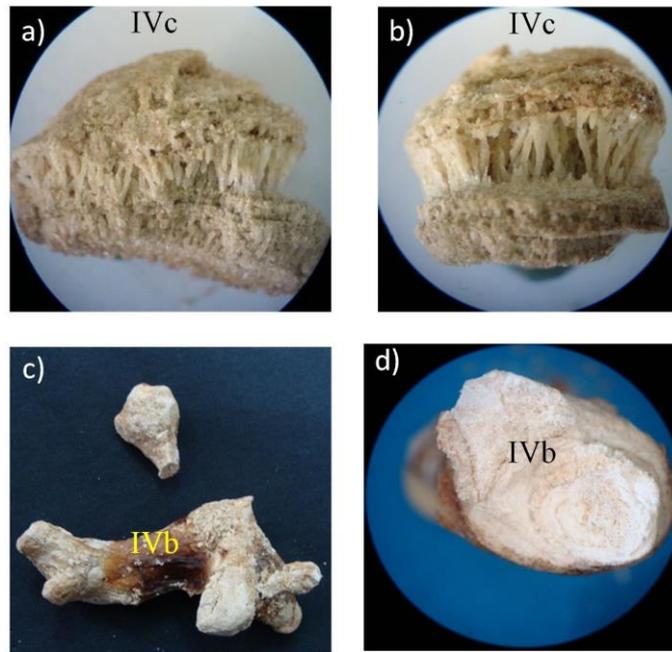
- Hyperparathyroïdie primaire (a) et (b)
- Infection urinaire à germes uréasiques (c) et (d)
- Initiation par hyperoxalurie et croissance par hypercalciurie (e) et (f)



**Figure 18 :** Lithiases de carbapatite sous les sous types IVa1 + IVa2 orientant vers une acidose tubulaire distale (a) et (b) et lithiase d’infection ayant la whitlockite (sous IVa1) et les protéines (sous VIb) comme composants prédominant (c) et (d)

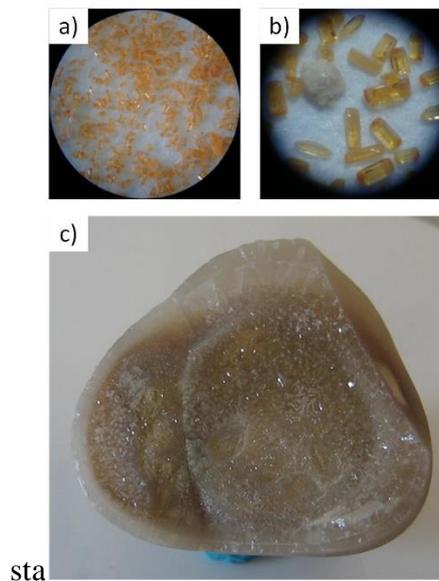
➤ *Morphologies de la lithiase de phosphate ammoniaco-magnésien hexahydraté (Struvite)*

La Struvite, qui est au fait le phosphate ammoniaco-magnésien hexahydraté (PAM), se forme dans les urines dans un contexte infectieux en raison de la présence exclusive de germes uréasiques. Elle se cristallise dans le système orthorhombique d’où la forme tabulaire ou prismatique qui la caractérise et permet de l’identifier facilement et la différencier des autres composants lithiasiques. Au niveau l’arbre urinaire la struvite se forme selon une morphologie de sous type IVc comme on la retrouve selon le sous type IVb lorsqu’elle est associée avec les autres phosphates calciques notamment la carbapatite. Dans la figure 19 sont représentées les deux morphologies de la struvite les plus fréquentes : la IVc où les cristaux de struvite sont bien apparents et la IVb où la struvite se présente en  $\mu$ cristaux mélangés avec ceux des phosphates calciques et notamment avec les sphérules de carbapatite. Les calculs ainsi formés peuvent avoir une dimension très importante qui leur permet d’épouser les cavités du rein (bassin et calices) et dans ce cas on dit qu’ils sont de type coralliforme (Fig 19c).



**Figure 19** : Struvite sous les morphologies IVc (100% struvite) et IVb (Struvite + Phosphate calcique).

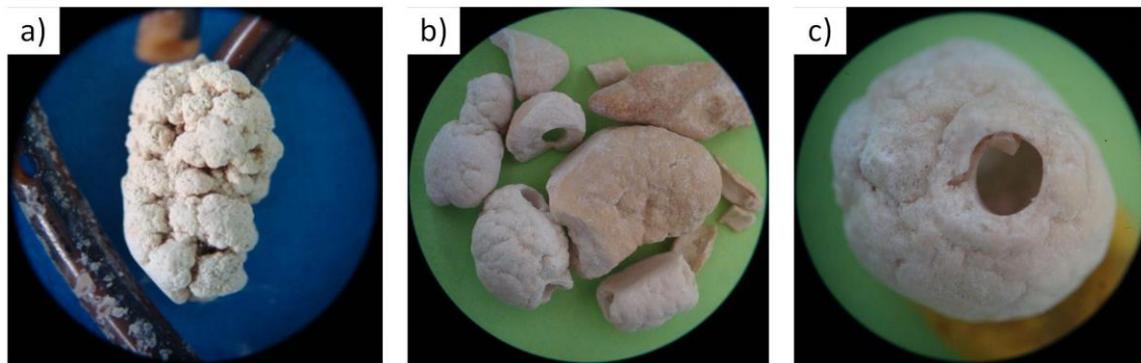
Dans certains cas la struvite se forme en sable composé au fait par des cristaux orthorhombiques de struvite en formes prismatique (forme de cercueil) (Fig : 20 a et b). On peut aussi retrouvés ces cristaux compressés et enrobés par une couche épaisse du même composant (struvite) érodé par frottement (Cas de stase) (Fig 20 c).



**Figure 20** : Lithiases de struvite particulière

- (a) et (b) Struvite en sable composé de cristaux prismatique (ou en forme de cercueil)
- (c) Cristaux de struvite enrobés à l'intérieur d'une couche épaisse du même composant érodé et lissée par frottement (cas de stase)

Dans certains cas la struvite se forme sur un corps étranger, notamment une sonde double J (sonde JJ). Cette dernière qu'on place pour prévenir ou contourner un obstacle au niveau de l'uretère devient un siège préférentiel de précipitation de composants lithiasiques. Le temps que doit garder le patient ce genre de sonde est variable et il peut se prolonger à 1 an d'où le risque accru de devenir un siège de germination et formation de lithiase. Dans le cas de la struvite, la cinétique de formation étant rapide et le risque d'enrober la sonde 2J par ce composant est important (Fig 21). La struvite peut dans certains cas couvrir une bonne partie de cette sonde ce qui nécessitera une intervention chirurgicale complexe pour la retirer.



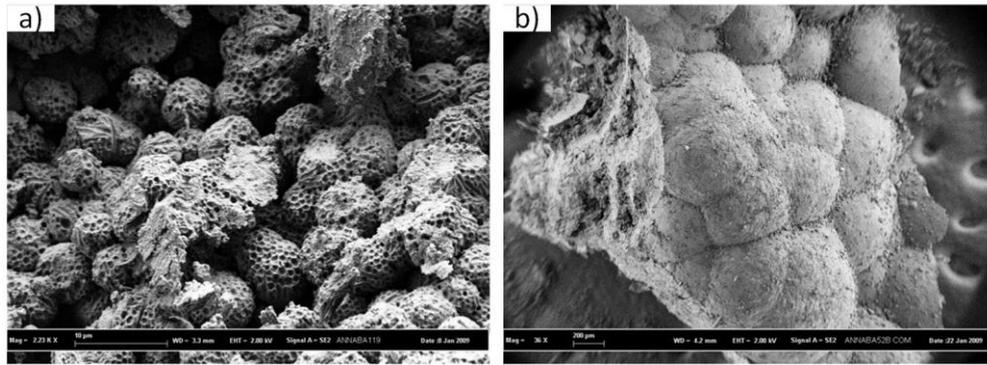
**Figure 21** : Struvite formé sur sondes 2J

- Sur une extrémité de la sonde (a)
- Touchant une grande partie de la sonde (b) et (c)

### ***1.3.2. Observations au Microscopique Electronique à Balayage***

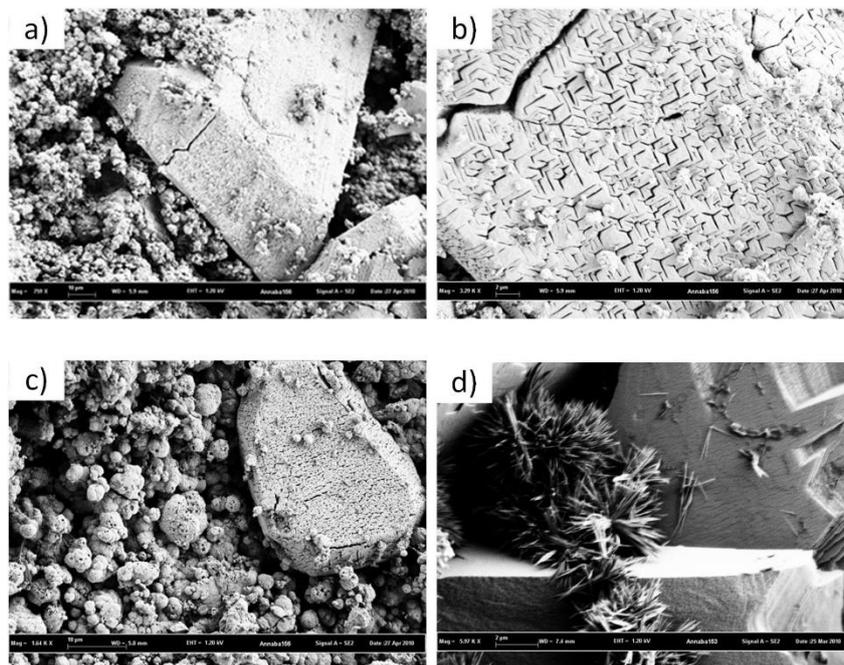
Ces observations ont été focalisées sur des composants phosphocalciques et sur la struvite. Les observations micrographiques à l'échelle mésoscopique (Pour nos échantillons entre 200 nanomètres et 200 micromètres) ont permis de constater que la Carbapatite (Carbonate apatite) se forme en sphérules. On cas de lithiase d'infection à germes uréasiques ces sphérules sont entachées en surface par des empreintes témoins de l'action de ces germes sur ce composant (Fig 22a). Dans un contexte non infectieux, cas d'hypercalciurie et/ou d'hyperphosphaturie, la surface des sphérules d'apatite est tout simplement dépourvue de ces empreintes (Fig 22b).

La structure intime de la struvite a été également révélée par microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 23). Elle se présente en bloc à surface striées présentant des empreintes en pattes d'oie (Fig : 23a et b).



**Figure 22 :** 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)

La composition globale des calculs d’infection est généralement hétérogène. Dans la figure 23c struvite est en présence de carbapatite dont les sphérules entachées d’empreintes en surface attestant leur réaction action des germes uréasiques. La figure 23d montre des aiguilles d’urates d’ammonium ségréguées en forme d’oursin en présence de struvite.



**Figure 23 :** Micrographies de struvite à l’échelle mésoscopique

- Bloc de struvite à surface striés se présentant sous forme d’empreintes en pattes d’oie (a) et (b)
- Struvite en présence de sphérules de carbapatite présentant des empreintes en surface attestant les caractères infectieux (à germes uréasiques) de la formation du calcul (c)
- Struvite avec de l’urate acide d’ammonium en forme d’oursin (d)

## I.4. Résultats

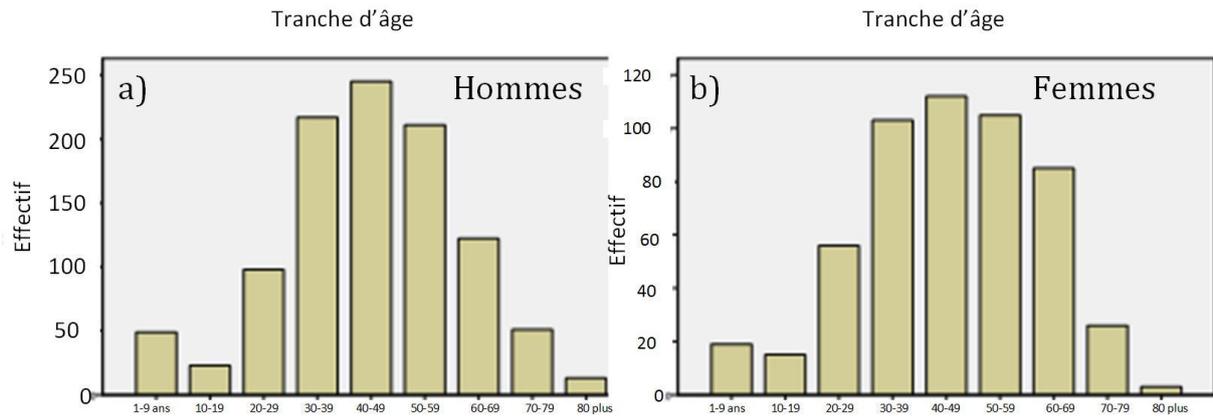
### I.4.1. L'évolution par le typage morphologique

Cette partie est un récapitulatif des observations effectuées afin de dégager les fréquences des différents types morphologiques et de leurs associations pour l'ensemble des 1553 cas lithiasique considérés dans cette étude. Notre cohorte est répartie par sexe en 1029 hommes et 524 femmes donc selon un ratio Hommes/femmes de 1,96. Dans le tableau 5 on a établi une répartition selon l'âge des patients qui a révélé une distribution en gaussienne autour d'un maximum au niveau la tranche 40-49ans.

**Tableau 5 :** Répartition des cas lithiasique selon l'âge

Tranches d'âge	Total	%	Homme	% H	Femme	% F
1-9 ans	68	4,4	49	4,8	19	3,6
10-19 ans	38	2,4	23	2,2	15	2,9
20-29 ans	154	9,9	98	9,5	56	10,7
30-39 ans	320	20,6	217	21,1	103	19,7
40-49 ans	357	23,0	245	23,8	112	21,4
50-59 ans	316	20,3	211	20,5	105	20,0
60-69 ans	207	13,3	122	11,8	85	16,2
70-79 ans	77	5,0	51	5,0	26	5,0
80 plus	16	1,0	13	1,3	3	0,6
<b>Total</b>	<b>1553</b>	<b>100</b>	<b>1029</b>	<b>100</b>	<b>524</b>	<b>100,0</b>

Une répartition en histogramme selon le sexe et l'âge des patients (Fig 24) montre dans l'ensemble des similitudes entre les deux sexes sauf pour la tranche 60-70 ans où la maladie lithiasique est plus prononcée chez les femmes.



**Figure 24** : Histogramme de la répartition des patients lithiasiques selon leur âge et leur sexe

Les observations micrographiques nous ont permis donc de dégager les types et sous types de l'ensemble des calculs de notre cohorte. Les résultats obtenus sont étalés dans le tableau 6. Dans ce dernier 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.

**Tableau 6 :** Fréquences des types morphologiques et leurs associations au noyau et en surface des calculs urinaires selon le sexe

Typage	NOYAU						RESTE DU CALCUL					
	Homme		Femme		Total		Homme		Femme		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
<b>I</b>	125	12,1	65	12.4	190	12.2	104	10.1	63	12.0	167	10.8
<b>II</b>	117	11.4	36	6.9	153	9.9	87	8.5	20	3.8	107	6.9
<b>III</b>	162	15.7	63	12.0	225	14.4	95	9.2	47	8.9	142	9.1
<b>IV</b>	118	11.4	109	20.8	227	14.6	69	6.7	57	10.9	126	8.1
<b>V</b>	17	2.24	20	3.8	37	2.4	16	1.6	20	3.8	36	2.3
<b>VI</b>	1	0.09	0	0	1	/	/	/	/	/	/	/
<b>Association de deux types morphologiques</b>												
<b>I+II</b>	74	7.3	21	3.4	95	6.1	184	17.9	68	13.0	252	16.2
<b>I+III</b>	37	3.6	12	2.3	49	3.04	58	5.6	30	5.7	88	5.7
<b>I+IV</b>	35	3.4	43	8.2	78	5.0	43	4.2	39	7.4	82	5.3
<b>I+VI</b>	1	/	3	0.6	4	0.25	1	/	1	0,14	2	0.13
<b>II+III</b>	13	1.3	8	1.5	21	1.4	9	0.87	4	0.76	13	0.84
<b>II+IV</b>	186	18.1	84	16.0	270	17.3	129	12.5	77	14.7	206	13.2
<b>III+IV</b>	8	0.8	6	1.1	14	0.9	17	2.24	10	1.9	27	1.74
<b>IV+VI</b>	2	/	/	/	/	/	2	/	0	0	2	0.13
<b>IV+V</b>	0	0	0	0	0	0	1	/	0	0	1	/
<b>Association de trois types morphologiques</b>												
<b>I+II+III</b>	7	0.64	1	0.19	8	0.51	21	1.92	5	0.95	26	1.7
<b>I+II+IV</b>	78	7.05	21	4.0	99	6.4	178	16.9	72	13.7	228	14.6
<b>I+III+IV</b>	1	0.32	3	0.6	4	0.3	4	0.32	3	0.57	5	0.32
<b>I+II+VI</b>	2	0.32	0	0	2	0.13	1	0.16	1	0.30	2	0.13
<b>II+III+IV</b>	1	0.16	0	0	1	/	0	0	2	0.38	2	0.13
<b>IV+III+VI</b>	2	0.32	0	0	2	0.13	1	0.16	1	0.14	2	0.13
<b>IV+VI+I</b>	1	0.16	0	0	1	/	1	0.16	0	0	1	/
<b>Association de quatre types morphologiques</b>												
<b>I+II+III+IV</b>	1	/	0	0	1	0.10	1	0.16	1	0.14	2	0.13
<b>I+II+IV+VI</b>	2	/	0	0	2	0.10	/	/	/	/	/	/
<b>Autres</b>	3	0.3	4	0.76	7	0.42	7	0.64	3	0.57	8	0.52
<b>Total existant</b>	994		499		1493		1029	100.0	524	100.0		100.0
<b>Manquant</b>	35		25		60		/	/	/	/	/	/
<b>TOTAL</b>	1029	100.0	524	100.0	1553	100.0	1029	100.0	524	100.0		100.0

Il ressort pour les deux sexes que le typage unique est beaucoup plus fréquent au niveau des noyaux que dans le reste des calculs (53,6% vs 37,2%) 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 : 14,6% vs Cal : 8,1%), le type III (Noy : 14,4% vs Cal : 9,1%) et le type II (Noy : 9,9% vs Cal : 6,9%). 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 : 17,3% vs Cal : 13,2%) alors qu'au niveau du reste du calcul c'est les associations I+II (Noy : 6,1% vs Cal : 16,2%) et I+II+IV (Noy : 6,4% vs Cal : 14,6%) qui prédominent. Ces tendances restent invariables avec le sexe des patients.

#### **I.4.2. L'analyse constitutionnelle des calculs**

##### ***I.4.2.1. Composition globale des calculs urinaires***

Dans le tableau 7 sont exposées les fréquences de présence des différents constituants lithiasiques dans l'ensemble des calculs analysés. L'oxalate de calcium monohydraté (Whewellite) présente globalement la valeur la plus élevée (77,6%) et notamment pour les deux sexes (H : 79,4% et F : 72,2%). Les phosphates de calcium, se présentent aussi avec des fréquences élevées où l'on relève pour la carbapatite une fréquence de présence globale de 59,7% équivalente à celle de la weddellite (61,8%). Les purines sont présentes avec des fréquences relativement importantes : 24,7% pour l'acide urique et 12% pour l'urate d'ammonium. La struvite est présente dans 7,9 % de même ordre entre de grandeur entre sexes. Pour les autres phosphates, Le phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) est retrouvé également à fréquence similaire pour les deux sexes (9,8%) cependant la brushite enregistre des fréquences réduites (H : 1,4% vs F : 0,6 %). Finalement la cystine s'affirme avec fréquence de présence de (2,4%).

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 7 :** Fréquence de présence des constituants dans les calculs selon le sexe des patients

Constituants	Homme	Femme	Total
	1029 / %	524 / %	1553 / %
<b>Oxalate de calcium</b>			
Whewellite	817/79,4	379/72,2	1196/77,6
Weddellite	685/66,6	275/52,5	960/61,8
<b>Phosphates de calcium</b>			
Carbapatite	625/60,7	302/57,6	927/59,7
Phosphate amorphe de calcium	99/9,6	53/10,1	152/9,8
Brushite	14/1,4	3/0,6	17/1,1
OCP	24/2,3	8/1,4	32/2,0
whitlockite	41/4,0	25/4,8	66/4,2
Struvite (PAM)	88/8,6	34/6,5	122/7,9
<b>Purines</b>			
Acide urique	238/23,1	145/27,7	383/24,7
Urate d'ammonium	104/10,1	82/15,6	186/12,0
Autres urate	5/0,5	11/2,1	16/1,0
Cystine	18/1,7	20/3,8	38/2,4
Divers	336/33,1	159/30,4	495/32,2

Divers : Xanthine, protéines, triglycérides, polysaccharides, médicaments...)

#### *1.4.2.2. Composants majoritaires dans les calculs*

Dans le tableau 8 sont rassemblées les fréquences des différents constituants majoritaires dans les calculs en fonction du sexe des patients. Les oxalates prédominent en tant que composant majoritaire dans les calculs avec une fréquence 65,4% des calculs sous forme de whewellite (45,3%) et à un degré moindre de weddellite (20,1%). Il s'en suit les acides uriques avec une fréquence de 13,4%, puis les phosphates calciques (10%) prédominés par la carbapatite (9,4%). En dernier lieu se positionnent la struvite (PAM) avec 3,7%, la cystine avec 2,4% et l'urate d'ammonium avec 0,9%.

**Tableau 8 :** Fréquence des constituants majoritaires dans les calculs selon le sexe des patients

<b>Constituants</b>	<b>Homme 1029/ %</b>	<b>Femme 524/ %</b>	<b>Total 1553/ %</b>
Oxalate de Ca	729/71,2	288/55,0	1017/65,4
Whewellite	474/46,3	230/43,9	704/45,3
Weddellite	255/24,9	58/11,1	313/20,1
Phos de Ca	75/7,3	81/15,5	156/10,0
Carbapatite	67/6,5	79/15,1	146/9,4
<i>Brushite</i>	7/0,7	2/0,4	9/0,6
<i>Phosphate amorphe de calcium</i>	1/0,1	0/0	1/<0,1
Struvite(PAM)	42/4,1	16/3,1	58/3,7
Acide urique	126/12,3	82/15,6	208/13,4
Urate d'ammonium	8/0,8	8/1,5	16/0,9
Cystine	19/1,9	22/4,2	41/2,4
Autres	16/1,6	21/4,0	37/2,4

#### ***I.4.2.3. Composants majoritaires dans les noyaux***

L'initiation de la formation du calcul est renseignée par sa partie centrale qui s'apparente généralement à un noyau. La composition de ce dernier oriente, de ce fait, vers la cause initiale de sa lithogénèse. En ce qui concerne la de croissance les orientations étiologiques peuvent être différentes du primaire de sa formation.

**Tableau 9 :** Fréquence des constituants majoritaires des noyaux selon le sexe des patients

<b>Constituants</b>	<b>Homme 1029 / %</b>	<b>Femme 524 / %</b>	<b>Total 1553/ %</b>
<b>Oxalate de Ca</b>	573/56,7	220/42,0	793/51,1
<b>C1</b>	395/38,4	169/32,3	564/36,3
<b>C2</b>	178/17,3	51/9,7	229/14,7
<b>Phos de Ca</b>	299/29,1	127/24,2	426/27,4
<b>CA</b>	288/27,9	117/22,3	405/26,1
<b>Autres PhCa</b>	11/1,1	10/1,9	21/1,3
<b>PAM</b>	44/4,3	22/4,2	68/4,4
<b>Ac Ur</b>	120/11,7	75/14,3	195/12,6
<b>UrAm</b>	21/2,0	28/5,3	49/3,2
<b>Cys</b>	19/1,8	22/4,2	41/2,6
<b>Autres</b>	25/2,4	32/6,1	57/3,7

Dans le tableau 9 on a reporté la fréquence des constituants majoritaires des noyaux selon le sexe des patients.

Le composant dominant dans le noyau est la whewellite (36,3%) suivi de la carbapatite (27,4%), puis de la weddellite (14,7%) et de l'acide urique (12,6%).

### I.4.3. Lithiase et infection

Les critères utilisés permettant d'identifier toute lithiase ayant trait à une quelconque infection de l'arbre urinaire sont : La présence de struvite (PAM), de phosphate de calcium avec un taux de carbonatation supérieure à 17%, un taux de phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) supérieur à 10%, de Whitlockite avec un taux de supérieur à 17% et finalement l'association de carbonates apatites avec l'urate d'ammonium. Les morphologies correspondantes en termes de sous-type sont IVc, IVb associé ou non avec du IVc et/ou du IVa<sub>1</sub>, IVa<sub>1</sub> soit avec une carbonatation supérieure à 15% ou comprenant du phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) avec un taux dépassant les 10%. On y trouve également l'association du IVa<sub>1</sub> avec du IIIId. Ainsi on a relevé dans notre cohorte de 1553 cas lithiasiques 222 (14,3%) lithiases en rapport avec l'infection des voies urinaires dont 121 (11,8%) pour le cas des hommes et 101 (19,3%) pour celui des femmes.

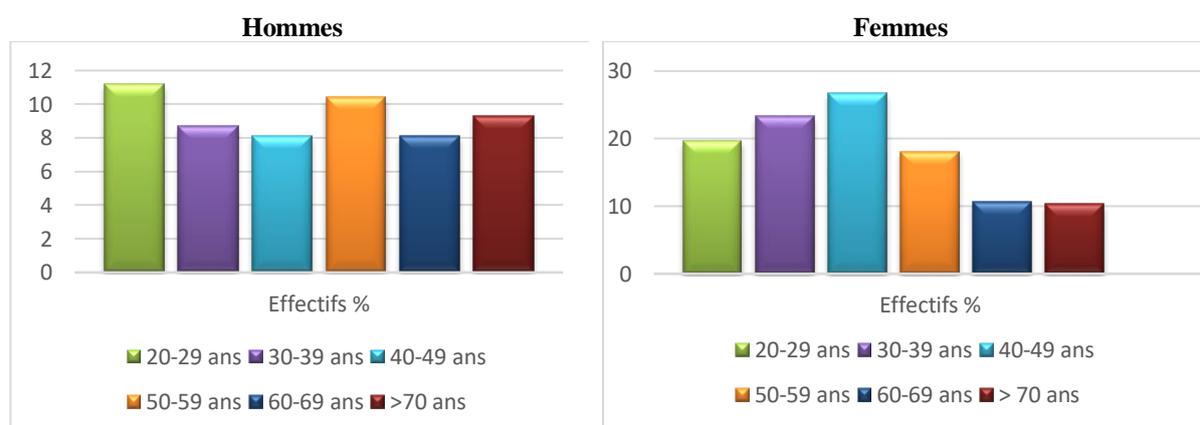
Une répartition selon l'âge des patients (tableau 10) montre que ce type de lithiase est observé dès l'enfance [0-9 ans] et l'adolescence [10-19ans] avec les fréquences le plus élevées de 44,1% et 21,1% respectivement. Pour les adultes son évolution reste assez régulières aux alentours de 13 à 14% jusqu'à 60ans et régresse légèrement vers 9% pour les âges les plus avancés (> 60ans).

**Tableau 10 : Répartition selon l'âge des patients**

Tranches Âge	Total = 222		Hommes n = 121		Femmes n = 101	
	Effectifs	%	Effectifs	%	Effectifs	%
1-9 ans	30	44,1	27	55,1	3	15,8
10-19 ans	8	21,1	6	26,1	2	13,3
20-29 ans	22	14,3	11	11,2	11	19,6
30-39 ans	43	13,4	19	8,7	24	23,3
40-49 ans	50	14,0	20	8,1	30	26,8
50-59 ans	41	13,0	22	10,4	19	18,1
60-69 ans	19	9,2	10	8,1	9	10,6
≥ 70 ans	9	9,7	6	9,3	3	10,3
<b>Total</b>	222	100,0	121	100%	101	100%

Fréquences par tranche d'âge (nbr de lithiases d'infections /nbr de lithiasiques par tranche d'âge)

Une répartition par sexe des patients montre clairement que les garçons sont les plus touchés par la lithiase d'infection (55,1% pour les moins de 10 ans) alors que pour les filles la fréquence est nettement inférieure (15,8%). A l'adolescence (de 10 à 19 ans) la prédominance masculine de la lithiase d'infection est maintenue mais au-delà, et pour toutes les tranches d'âge, cette prédominance est nettement féminine du moins jusqu'à 60 ans. Si dans le cas des hommes adultes la lithiase d'infection semble se stabiliser à partir de 20 ans elle présente pour les femmes une évolution modérée culminant à 26,8% entre 40 et 49 ans puis s'amortie progressivement à partir de 50 ans (Fig 25)

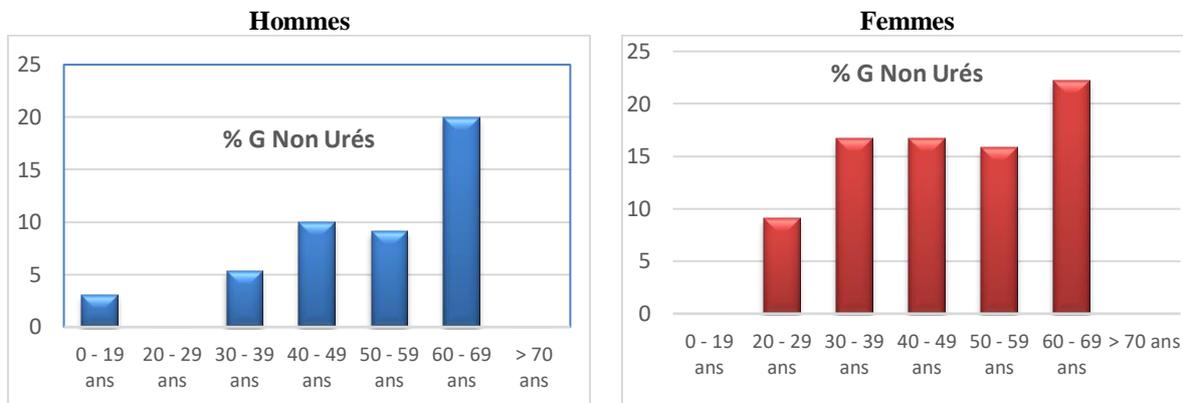


**Figure 25 :** Histogrammes des fréquences de la lithiase d'infection par tranche d'âge et le sexe des patients adultes.

A ce niveau, une décanation s'impose pour distinguer le caractère uréasique de celui non uréasique des germes mis en jeu dans la formation des calculs en rapport avec l'infection de l'arbre urinaire. En outre, l'infection urinaire peut être la cause d'initiation du calcul (calcul d'infection) comme elle peut se manifester secondairement au niveau d'un calcul initié dans des conditions non infectieuses (calcul secondairement infecté).

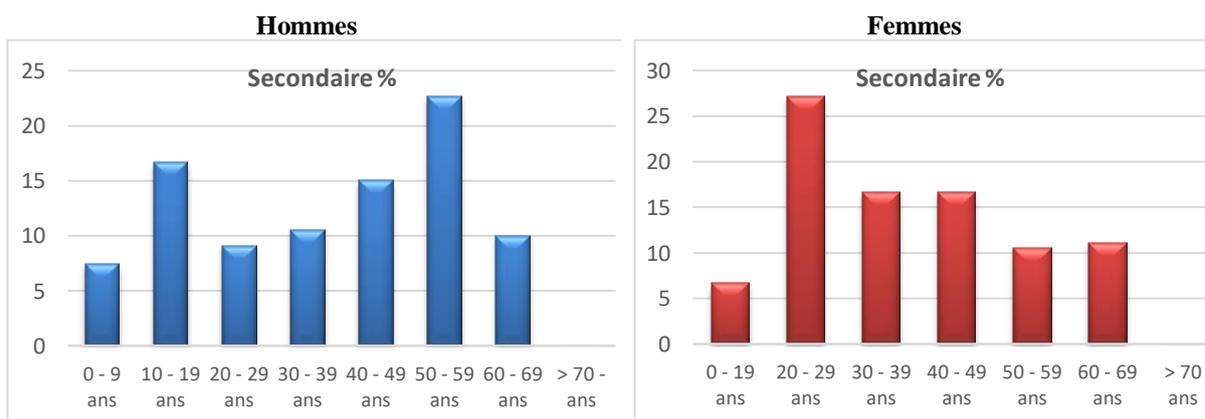
Pour le premier aspect évoqué on a relevé 196 calculs (88,3 %) où l'infection est due à des germes uréasiques dépassant d'une façon conséquente les cas où l'infection est en rapport à des germes non-uréasiques. En fonction du sexe cette tendance est plus marquée chez les hommes (Hommes : 93,4% vs Femmes : 82,2%). Dans la figure 26, sont représentés les fréquences des infections à germes non uréasiques par tranche d'âge et par sexe des patients ayant une lithiase d'infection. Dans le cas des hommes ce type de lithiases augmente assez régulièrement jusqu'aux âges les plus avancés pour atteindre une fréquence de 20% pour les [60-69 ans]. Pour le cas des femmes la tranche [60-69 ans] est également la plus marquée pour ce type de lithiases avec une fréquence de 22,2% mais leur évolution avec l'âge n'est pas aussi régulière.

Pour le second aspect, on a relevé 191 (soit 86%) lithiases ayant été la cause première de la formation des calculs d'infection (calculs d'infection) versus 31 (soit 14%) lithiases où l'infection est secondaire à une autre cause de germination donc d'initiation du calcul (calculs infectés).



**Figure 26 :** Fréquence des lithiases à germes non urésiques par sexe et pour chaque tranche d'âge

Omis les calculs secondairement infectés, la lithiase d'origine infectieuse ne représente donc que 12,3% de notre cohorte de 1553 cas lithiasiques. Une répartition selon le sexe des patients montre que ces lithiases représentent 10,3% des lithiases masculine versus 16,2% des lithiases de sexe féminin.



**Figure 27 :** Fréquences des lithiases infectées par sexe et pour chaque tranche d'âge

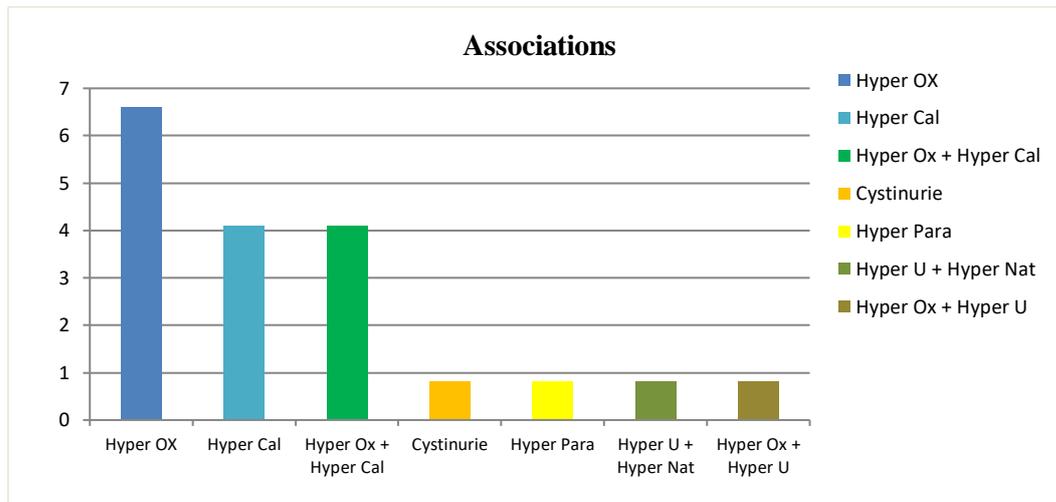
Dans la figure 27 sont représentées les fréquences de ces lithiases infectées pour chaque tranche d'âge par sexe des patients. Dans le cas des hommes adultes, la tranche [50-59ans] présente la proportion la plus importante ( $5/22=22,7\%$ ) atteinte après une évolution régulière

dès la troisième décennie. Dans le cas des femmes c'est cette troisième décennie qui présente le plus de lithiases infectées (27,2%) et ces dernières se stabilisent de 30 à 49 ans à 16,7% pour finalement s'abaisser vers 11% de 50 à 70 ans. Un récapitulatif de l'ensemble des résultats de ces deux aspects (type de germes et infection primaire/secondaire) est donné par le tableau 11.

**Tableau 11 :** Récapitulatif de l'ensemble des résultats (par sexe et tranches d'âge) des types de germes et de l'origine de l'infection

Tranches d'Âge	Types de Germes						Origine de l'Infection					
	Femmes 101		Hommes 121		Total		Femmes		Hommes		Total	
	Ur	N Ur	Ur	N Ur	Ur	N Ur	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>er</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>er</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>er</sup>
0-9 ans	3	0	26	1	29	1	1	2	2	25	3	27
10-19 ans	2	0	6	0	8	0	0	2	1	5	1	7
20-29 ans	10	1	11	0	21	1	3	8	1	10	4	18
30-39 ans	<b>20</b>	4	18	1	<b>38</b>	5	4	<b>20</b>	2	17	6	<b>37</b>
40-49 ans	24	<b>6</b>	18	2	42	<b>8</b>	5	<b>25</b>	3	17	8	<b>42</b>
50-59 ans	16	3	20	2	36	5	2	17	5	17	7	34
60-69 ans	7	2	8	2	15	4	1	8	1	9	2	17
>70 ans	3	0	6	0	<b>9</b>	0	0	<b>3</b>	0	6	0	<b>9</b>
<b>Total effectif</b>	83	18	113	8	196	26	16	85	15	106	31	191
<b>Ur : germes uréasiques</b>							<b>2<sup>nd</sup> : Infection secondaire</b>					
<b>N Ur : germes non uréasiques</b>							<b>1<sup>er</sup> : Infection primaire</b>					

Dans l'ensemble la lithiase liée à l'infection de l'arbre urinaire peut dans certains cas s'accompagner par d'autres étiologies. Dans notre série on a enregistré environ 18 % des cas ou l'infection est associée à d'autres causes d'origine non infectieuse dont les plus importantes sont l'hyperoxalurie (6,6%), l'hypercalciurie (4,1%) à égale fréquence avec l'association hyperoxalurie-hypercalciurie (Fig 28).



**Figure 28 :** Histogramme donnant les principales étiologies associées à la lithiase liée à l'infection de l'arbre urinaire

## I.5. Discussion

Dans cette partie de notre étude une cohorte de 1553 cas lithiasiques a été considérée comme échantillonnage de notre étude épidémiologique sur la lithiase d'infection au niveau de la région Est Algérien. Dans l'ensemble, le ration Homme/Femme, étant de 1,96 (Hommes : 1029 vs Femmes : 524), permet d'affirmer la prédominance masculine de cette pathologie avec une valeur comparable avec celles des pays industrialisés (Daudon *et al*, 2008; Daudon, 2005; Charles *et al*, 2012; Vincent *et al*, 2015; Alapont Perez *et al*, 2001) et ceux du Maghreb arabe (Djelloul *et al*, 2006; Alaya *et al*, 2012; Boumzaoued *et al*, 2015). La répartition selon l'âge et le sexe des patients fait ressortir une forme gaussienne maximisée, pour les deux sexes, au niveau de la tranche d'âge 40-49ans. Cependant, dans le cas des femmes, une recrudescence de cette pathologie est notée entre 50-69 ans contrairement aux hommes pour lesquels on note une baisse remarquable au-delà de 50 ans.

Selon l'approche morpho constitutionnelle (Daudon, 2000) et au premier abord, l'aspect morphologique nous a été d'une importance capitale pour distinguer et identifier les cas de lithiases en rapport avec l'infection de l'arbre urinaire. En effet, ce genre de calculs se distingue

par le typage IV et plus précisément par les sous-types IVc, IVb et aussi IVa<sub>1</sub>. Pour les deux premiers sous-types l'infection est, dans tous les cas, à germes uréasiques tandis que pour le sous type IVa<sub>1</sub> la lithiase n'est pas toujours liée l'infection et si c'est le cas, elle est peut-être due à des germes non uréasiques. Il y a lieu de signaler que le type IV englobe également des lithiases d'hypercalciurie et/ou d'hyperphosphaturie avec le sous-type IVa<sub>1</sub>. Dans notre série et comme typage unique, indépendamment des étiologies, le type IV enregistre la fréquence la plus élevée au sein des noyaux des calculs et sa fréquence reste conséquente dans le reste des calculs (section et surface). Ce typage s'associe assez bien avec le type II (cas d'hypercalciurie) (Daudon *et al*, 1993) et le type I (sous type Ia) et plus particulièrement sous forme de plaque de Randall en cas de calcification papillaire (Letavernier et Daudon, 2016). Les lithiases associant les sous-types IIIId (majoritaire en UrAm) avec IVa<sub>1</sub> se développent également à partir d'un environnement infectieux. Généralement, l'association entre les sous-types du type III oriente vers une hyperuricurie avec ou sans hyperuricémie.

Les calculs d'infection ont une morphologie ramifiée, complexe ou coralliforme de dimension importante témoignant de leur évolution chronique caractérisée donc par une cinétique de croissance rapide (Coe *et al*, 2005). Cependant, L'aspect ramifié et, au-delà, coralliforme n'est pas spécifique aux lithiases d'infection car on le retrouve également pour d'autres composants lithiasiques comme la cystine, l'acide urique et les calculs de composition mixte oxalo-phosphocalciques (Akagashi *et al*, 2004). Pour le sous type IVc on peut observer par loupe binoculaire différents facies de cristaux de struvite et leurs enchevêtrements.

L'aspect morphologique a été considéré pour identifier les différentes zones d'hétérogénéité au sein du calcul ce qui nous a permis non seulement de choisir les zones des prélèvements pour l'analyse spectroscopique mais aussi de distinguer les calculs d'infection des calculs infectés. La morphologie et la composition du nidus du calcul sont des éléments tranchants pour faire cette distinction. Dans notre série on a également rencontré des lithiases de struvite (sous type IVc et IVb) formés sur corps étrangers en l'occurrence des endoprothèses urétérales de type double J (sondes 2J). Il se trouve que dans certains cas la sonde 2J favorise le dépôt protéique propice à l'adhérence des bactéries elles-mêmes précurseurs à la formation d'une matrice polysaccharidique appelée biofilm (Sohshang *et al*, 2000; Nickel *et al*, 1985). Ces bactéries lithogènes, entretiennent par la suite la formation de composants lithiasiques qui incrustent ce corps étranger (Hedelin, 2002). Dans notre série, on a noté que la struvite est le composant le plus fréquent dans ces incrustations à raison de 3/5 des cas ce qui reste conforme aux premières études sur ce sujet (Westbury, 1974; Sofer et Denstedt, 2000) mais décaler par d'autres études

plus récentes où les incrustations par des composants caractéristiques de l'infection comme la struvite sont devenus moins fréquents (Roupret et al, 2005; Bouzidi et al, 2008). Dans ce sens, il est à signaler qu'une amélioration des matériaux des sondes ainsi qu'une antibioprophylaxie adéquate expliquent en partie cette réduction des incrustations d'origine infectieuse (Chew, 2006; Shaw et al, 2005).

On a constaté que les composants lithiasiques se présentent également sous une morphologie caractéristique à l'échelle mésoscopique. Pour ce qui est de la struvite, les observations aux MEB montrent des surfaces planes striées en pattes d'oie. A cette échelle, on a également mis en évidence des sphérules de Carbapatite (CA) avec une surface criblée évoquant des empreintes bactériennes lorsque ce composant est mélangé avec la struvite (contexte d'infection à germes uréasiques) et d'autres, formées dans un contexte d'hypercalciurie, qui sont dépourvues de ces empreintes en surface. Ce résultat, déjà notifié par des études antérieures (Delatte et Santos, 1977; Leusmann, 1982), a été corrélé avec la présence de phosphate de calcium carbonaté amorphe (ou whitlockite) et CA avec un ratio de carbonate élevé (>15%) en cas d'infection à germes uréasiques (Carpentier et al, 2009.).

L'analyse constitutionnelle par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) qui s'ensuivit nous a permis de se fixer sur l'ampleur de la lithiase ayant trait à l'infection de l'arbre urinaire à partir de notre série de 1553 cas lithiasiques. En se basant sur les critères permettant de mettre en cause la lithiase d'infection (Maurice-Estépa et al, 1999), on a relevé 222 (14,3%) lithiases de ce type dont 121 (11,8%) des hommes lithiasiques et 101 (19,3%) des femmes de notre série. L'infection urinaire est, de ce fait et dans l'ensemble, à prédominance féminine touchant environ deux fois plus de femmes que d'hommes. Une répartition selon l'âge des patients montre que la tranche 40-49 ans est la plus touchée par l'infection. Selon le sexe des patients on note cependant des différences notables notamment pour les enfants (de 0 à 9 ans) où la lithiase d'infection est plus de trois (03) fois plus prononcée chez les garçons que les filles (G : 55,1% vs F : 15,8%) et également, à un degré moindre, pour les adolescents (H : 26,1% vs F : 13,3%).

En outre, l'évolution de la lithiase d'infection chez les hommes fluctue modérément (de 11 à 8 %) depuis l'âge 20 ans jusqu'aux âges les plus avancés. Pour ce qui est des femmes adultes, on enregistre une fréquence maximale pour la tranche 40-49ans précédée par une progression régulière depuis la troisième décennie et suivie d'une régression assez rapide.

Les germes mis en jeu pour ce genre de lithiase peuvent être uréasique (Lerner et al, 1989; Rivadeneyra et al, 1999) ou non uréasique (Bruyerea et al, 2008; Rieu, 2005.). Pour ce qui est

du premier type les principaux germes producteurs d'uréase impliqués dans la genèse des calculs urinaires d'infection sont dans l'ordre décroissant les *Proteus* (toutes espèces) suivis par *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylocoques aureus* et *epidermidis*, *Pseudomonas*, et les *Providencia spp* (la plupart des espèces). Les germes non uréasiques impliqués dans l'infection urinaire sont principalement les *E.coli* et certaines entérobactéries et les facteurs lithogènes dans ce cas sont (Daudon, 2013):

- L'hypocitraturie, par consommation bactérienne de citrate,
- La production de peptidoglycanes pouvant capter les ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  et induisant secondairement la cristallisation de phosphate calcique et magnésien (cas de *E.coli*)
- L'inhibition de l'urokinase et formation de matrices muco-protéiques pouvant entretenir une cristallisation minérale secondaire

Les composants lithiasiques pouvant être liée aux germes non uréasiques sont (Daudon, 2013):

- La Whitlockite (Wk) qui est un phosphate mixte de magnésium et de calcium dépourvu de carbonate et d'ammonium
- Le Phosphate Amorphe de Calcium Carbonaté (PACC) qui se forme spontanément dans les urines des sursaturations phosphocalciques.

A partir de l'analyse morpho-constitutionnelle et en tenant compte des considérations suscitées on a constaté que 88,3 % de nos lithiases d'infection résultent de germes uréasiques soit 12,6% de l'ensemble des calculs dont 11% des hommes et 15,8% des femmes. Cela dénote que le processus de nucléation à partir de germes producteurs d'uréase s'impose fortement dans la lithogénèse infectieuse de notre série. Pour ce qui est des calculs d'infection et calculs infectés on a pu constater que la lithiase d'origine infectieuse présente 12,3% de notre cohorte de 1553 lithiases ce qui se traduit par sexe des patients : 10,3% pour les hommes versus 16,2% pour le sexe féminin.

Pour ce qui est de la lithiase d'infection dans les pays industrialisés plusieurs études relatent sa régression pendant ces 40 dernières années suite à une bonne médicalisation des populations et du haut niveau de développement socioéconomique de ces pays (Rieu, 2005; Miano et al, 2007). Il se trouve que dans ces études l'unique facteur considéré pour déterminer la lithiase d'infection était la présence (quelle que soit la proportion) du phosphate ammoniaco-magnésien ou struvite (PAM). Il se trouve qu'effectivement la proportion de ce constituant lithiasique en tant que composant majoritaire a considérablement diminué (1,3% en France) mais pas pour autant concernant la lithiase d'infection lorsqu'elle est révélée par l'ensemble des facteurs précurseurs de cette lithiase (Maurice-Estépa et al, 1999). Dans ce sens, une étude Allemande

assez récente (Bichler et al, 2003) estime la proportion de la lithiase d'infection à 15% de l'ensemble des lithiases de l'arbre urinaire, dénotant ainsi une valeur plutôt élevée. Il faut rappeler que dans notre série la fréquence de la struvite en tant que composant majoritaire est de 4,4% dans les noyaux et 3,7% dans le reste des calculs (section et surface) alors que la lithiase d'infection a été estimée pour l'ensemble des cas lithiasiques à 14,3%.

Pour ce qui de la lithiase d'infection de l'enfant, l'étude de Daudon et al. (2008) a fait ressortir des fréquences assez élevées pour les enfants en France notamment pour les nourrissons garçons où sa valeur est de 55,6% et filles avec 35,1%. Pour les lithiasiques adultes moins de 60 ans cette même étude enregistre, au cours des années 2005-07, des fréquences de la lithiase d'infection fluctuant autour de 7% pour les hommes et 17% pour les femmes. Ces valeurs, reste assez proches à celles de notre série. Cette étude mentionne également une recrudescence de la lithiase d'infection au-delà de 60 ans notamment pour les femmes où elle avoisine les 27%. Ce résultat n'a pas été observé pour notre série, bien au contraire, les fréquences tendent plutôt vers la baisse et plus particulièrement pour les femmes. De notre part, on estime que cela est peut-être dû au faible effectif de notre série pour ces tranches d'âge.

## **I.6. Conclusion :**

Le profil épidémiologique de la lithiase des voies urinaires au niveau de la région « Est Algérien » présente plusieurs similitudes avec celui des pays industrialisés. Les oxalates de calcium avec leurs deux formes (C1 et C2) prédominent dans cette série suivis des phosphates de calcium représentés principalement par la carbapatite. Cette dernière peut être due à plusieurs causes dont l'infection urinaire. Dans notre série, la lithiase ayant trait à la l'infection de l'arbre urinaire a été détectée en premier par la simple présence de la struvite qui le composant caractéristique de ce type de lithiase. Cependant d'autres critères, dont la présence avec certains seuils de Whitlockite(WK), de Phosphate amorphe (PACC), de carbonatation de la carbapatite (CA) ainsi que les mélanges d'urate d'ammonium et composants phosphocalciques, ont été considérés pour bien cerner l'impact de ce type de lithiase. Ainsi, on a pu constater que l'infection de l'arbre urinaire reste une cause non négligeable de néphrolithiase. Pour les personnes adultes elle est à prédominance féminine (environ 2 femmes pour 1 homme) mais pour les enfants de moins de 10 ans c'est les garçons qui sont de loin les plus touchés par ce de lithiase.

**Partie II**  
***Lithogénèse d'infection in  
vitro***

## II.1. Introduction

L'étude du processus de formation des cristaux est connue sous le nom de cristallogenèse. Au fait, la cristallisation se produit aussi bien naturellement qu'artificiellement au laboratoire et dans le cas de la lithiase rénale, le phosphate de magnésium et d'ammonium hexahydraté,  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , communément appelé struvite, la cristallisation est générée naturellement par des micro-organismes uréolytiques. Ce composant est également le composant cristallin le plus commun des calculs infectieux (Daudon, 2015; Manzoor et al, 2018).

La formation éventuelle d'une structure cristalline à partir d'une solution aqueuse sursaturée se fait selon les processus de nucléation de l'espèce cristalline, de sa croissance et éventuellement de sa ségrégation. L'ensemble de ces processus sont gouvernés par la chimie globale de la solution et son pH. Lors d'une cristallisation in-vivo ces processus sont souvent renforcés par la présence de surfaces biologiques telles que des parois cellulaires bactériennes et les capsules (Mann S, 1983 & Beveridge 1989). Dans le cas de la struvite, sa nucléation dans les urines (in-vivo) nécessite plusieurs conditions dont un pH, un produit molaire  $(\text{Mg})(\text{NH}_4)(\text{PO}_4)$  et une concentration en ammoniaque qui soient élevés. Ces conditions, rarement réunies dans une urine normale, sont tributaires de la présence de micro-organismes porteurs d'uréase (ou de désaminase) dont le rôle est de produire de l'ammonium à partir des composants de l'urine (urée, amino-acides). Il en découle ainsi une alcalinisation de l'urine d'où l'élévation du pH urinaire. Ce processus qui s'articule sur la présence de germes uréasiques dans les urines permet donc de former de la struvite mais également et souvent d'autres types de composants dont le phosphate de calcium carbonaté (avec une carbonatation élevée) et l'urate d'ammonium.

Bien que peu probable, la formation de struvite en milieu acide est possible mais elle nécessite cependant un produit molaire très important contrairement à sa formation en milieu alcalin où le produit molaire peut-être relativement très faible (Boistelle et Abbona, 1981).

Dans cette partie de notre travail, on s'est proposé d'étudier la cristallogenèse de la struvite, par une expérience (in-vitro) sur la germination et la croissance des cristaux de struvite en présence de micro-organismes uréolytiques comme c'est le cas de leur formation dans des urines réelles.

## II.2. Matériels et méthodes

### II.2.1. Matériels

#### II.2.1.1. Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, d'origine clinique proviennent de prélèvement d'une urine des patients lithiasiques du service d'urologie du CHU Ibn Rochd Annaba.

Le choix de ces bactéries a été dicté par les objectifs notre étude : Test du pouvoir de cristallisation de la struvite; en tenant compte de leur activité uréasique qui selon la littérature est (Daudon et al, 2012) :

- Fortement positive (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*)
- Moyenne (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*)
- Nulle (*Escherichia coli*)

#### II.2.1.2. Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes testées sont entretenues par repiquage sur la gélose nutritive (GN). Elles sont incubées pendant 24h à 37 °C et conservées à 5 °C dans des tubes contenant de GN incliné.

### II.2.2 Méthodes

#### II.2.2.1 Souche utilisées pour la cristallisation de la struvite

La pureté et l'identification biochimique de l'isolat bactérien a été effectuée dans le cadre d'un mémoire de fin d'étude en master spécialité microbiologie niveau du laboratoire de microbiologie Appliquée université Badji Mokhtar Annaba.

#### II.2.2.2. Test de cristallisation in vitro

##### ✓ Principe

Ce processus de cristallisation in-vitro est similaire à celui qui s'établit lors de la formation de struvite in-vivo du moment qu'il est initié par des bactéries uréasiques. Elle repose sur l'inoculation de l'urine synthétique par des bactéries uréasiques à 0.5 McFarland. L'on constate qu'après un certain temps de contact entre l'urine et la bactérie cible à 37°C, les cristaux de struvite se forment. Par la suite, cette formation de cristaux est appréciée par observation au

microscopique à l'aide d'un microscope à polarisation et l'identification de la nature des cristaux formés s'est effectuée par analyse spectrale.

#### ✓ Mode opératoire

Le processus de la cristallisation in vitro, a été induit par la présence des bactéries testées dans des urines synthétiques stériles.

#### - Préparation des urines synthétiques

L'urine artificielle a été préparée juste avant l'expérience selon le protocole décrit par [Agnieszka et al. \(2003\)](#) et qui s'énonce comme suit :

- a) Mettre, Dans un bécher stérile, les composants chimiques suivants dans l'eau distillée (en g/l):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0.651,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  : 0.651, NaCl : 4.6,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  : 2.3, Sodium Citrate : 0.65, Sodium Oxalate : 0.02,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 2.8, KCl : 1.6,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  : 1.0, Urée : 25.0, Créatine : 1.1 et du TSB : 10.0. Ces composants minéraux correspondent à la concentration moyenne constatée au cours d'une période de 24h dans l'urine humaine normale. Le TSB a été ajouté pour stimuler la croissance bactérienne sans pour autant interférer dans le processus de précipitation ([Prywer et al, 2015](#)).
- b) Ajuster le pH initial à 5,8
- c) Stérilisation de l'urine par filtration à travers un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  dans des flacons stériles en verres de 200ml
- d) Conservation de la préparation à 4 °C pendant une semaine avant utilisation.

#### - L'inoculation des urines synthétiques

Elle s'est effectuée selon les étapes suivantes :

- a) A partir d'une culture jeune de 18h, sur un Bouillon Tryptone Soja (TSB), prélever, à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques de chacune des souches bactériennes à étudier pour introduire chacune d'elle dans 10 ml de TSB.
- b) Bien homogénéiser chaque suspension bactérienne à l'aide d'un vortex.
- c) Infecter les flacons d'urine stérile par les différentes souches bactériennes testées à 0,5 McFarland ou à une D.O de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm dans le spectrophotomètre
- d) Incuber les urines infectées à 37°C pendant 24h.
- e) Un prélèvement de 5 ml a été effectué chaque une heure pour les premières huit heures et finalement à 24h de l'inoculation.

- f) Pour chaque prélèvement on effectue systématiquement une mesure de la D.O à 600 nm, une mesure du pH ainsi qu'une observation au microscope à polarisation doté une cellule de type Malassez pour évaluer le dénombrement et la dimension des cristaux et agrégats cristallins.
- g) Le témoin négatif contient l'urine synthétique uniquement.

✓ **Lecture**

Observation des cristaux formés par sous microscope à polarisation et identification des différents faciès cristallins

**II.2.2.3 Identification de la nature des cristaux produits par Spectrophotométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)**

✓ **Principe**

Cette technique analytique (FTIR) est basée sur l'interaction du rayonnement électromagnétique Infrarouge avec la matière et permet d'identifier les molécules contenues dans la matière à analyser. De ce fait, le FTIR a l'avantage d'analyser la matière dans ces différents états : organique, minéral, amorphe, huileux et mou (protéique) car elle se base justement sur l'absorption de l'énergie à l'échelle moléculaire.

La Spectrophotométrie Infrarouge traite un faisceau lumineux Initial unique à large bande par un interféromètre de Michelson qui permet d'avoir différentes longueurs d'ondes modulées à des vitesses différentes. Ainsi le faisceau sortant de cet interféromètre possèdera un spectre variable dans une gamme de longueur d'onde moyen infrarouge (de  $400\text{cm}^{-1}$  à  $4000\text{cm}^{-1}$  c.à.d. de  $25\mu\text{m}$  à  $2,5\mu\text{m}$ ). Pour chaque faisceau on mesure l'absorption de l'énergie par l'échantillon et le spectre résultant final est une moyenne de 72 scans déterminée par traitement informatique des données en utilisant un algorithme (Transformation de Fourier) pour convertir les données brutes de la lumière absorbée en données exploitables.

✓ **Mode opératoire et préparation des échantillons**

- Centrifuger les résidus des différents échantillons à 4000trs/min pendant 10 min.
- Récupérés et séchés les résidus obtenus à l'air libre.
- Mélanger chaque culot desséché au Bromure de Potassium (KBr) à raison de 1,0g pour 100g de KBr dans un mortier en agate
- Compresser la poudre obtenue sous forme de pastille à 13mm de diamètre et 1mm d'épaisseur.

### ✓ Lecture

Le spectrophotomètre FTIR utilisé est de type BRUCKER alpha ayant une étendue de longueur d'onde de  $25\mu\text{m}$  à  $2,5\mu\text{m}$  ( $400\text{cm}^{-1}$  à  $4000\text{cm}^{-1}$ ) dont les données sont traitées par le logiciel OPUS disposant (optionnellement) d'une banque de données pour le dépouillement des spectres par l'identification des vibrations révélées (Daudon et al, 1978; Verma et al, 2021)

## II.3. Résultats

### II.3.1 Pouvoir de cristallisation in vitro :

Les micrographes présentées dans la figure 29 illustrent la formation des cristaux d'origine infectieuse qui se sont développés à long terme pour l'ensemble des urines synthétiques inoculées.

Ces observations fournissent également une perspicacité dans la façon avec laquelle les bactéries parviennent à coloniser les urines de l'appareil urinaire.

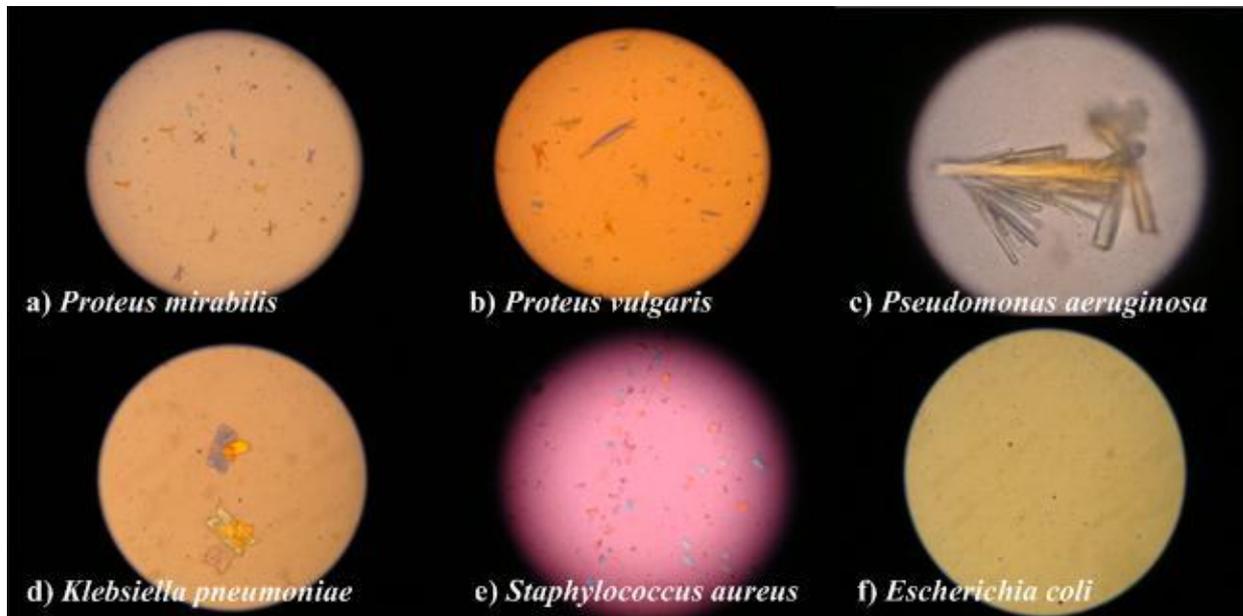
Le premier test de cristallisation consiste à déterminer, pour l'ensemble des urines synthétiques inoculées par les différentes bactéries testées, la formation ou non des cristaux de phosphate ammoniacomagnésien (PAM) pour un séjour d'incubation maximisé, pour certains cas, jusqu'à 120 h.

Dans cette optique, les observations effectuées par microscope à polarisation de ces urines synthétiques ont révélé que la formation de ces cristaux d'origine infectieuse (cristaux de struvite) concerne toutes les bactéries testées à l'exception de la souche *Escherichia coli* (Fig 29f). Il convient de noter que lorsque ces bactéries ont été cultivées dans du bouillon nutritif, aucun résidu cristallin n'a été observé.

Nous avons observé des cristaux d'origine infectieuse sous différents faciès facilement identifiables. Pour ce qui est des espèces *Proteus* ces cristaux s'apparentent à des cristaux de Struvite ayant une forme caractéristique en X (Fig 29 a-b) (Daudon et Jungers, 2004; Daudon, 2003). Ceux générés par *Pseudomonas aeruginosa* se cristallisent en de longues baguettes orthorhombiques polarisantes (Daudon, 1987). Ces cristaux en baguettes sont souvent agrégés en rosettes (Fig 29c) et morphologiquement identifiés comme étant de la struvite).

Les faciès des cristaux induits par *Staphylococcus aureus* sont de forme tabulaire, de trapèze ou bien prismatique mais souvent aussi sous forme de lingots d'or ou de couvercle de cercueil (Fig 29e) (Prywer et Torzewska, 2010; Daudon 2013; Rizzi et al, 2017; Katica et al, 2020). Tous ces faciès sont connus comme celle de la struvite. D'autres faciès de ce même composant

en forme de papillon ont été formés lors de l'inoculation des urines synthétiques par *Klebsiella pneumoniae*. (Fig 29d) (Jörn et al, 2019; Ozaki et al, 2022).



**Figure 29:** Micrographies obtenues par Microscopie à polarisation révélant les urines synthétiques inoculées ayant formées de cristaux de Struvite à l'exception d'*Escherichia coli*

### II.3.2. Evolution de la cristallerie en fonction du temps pour les différentes urines

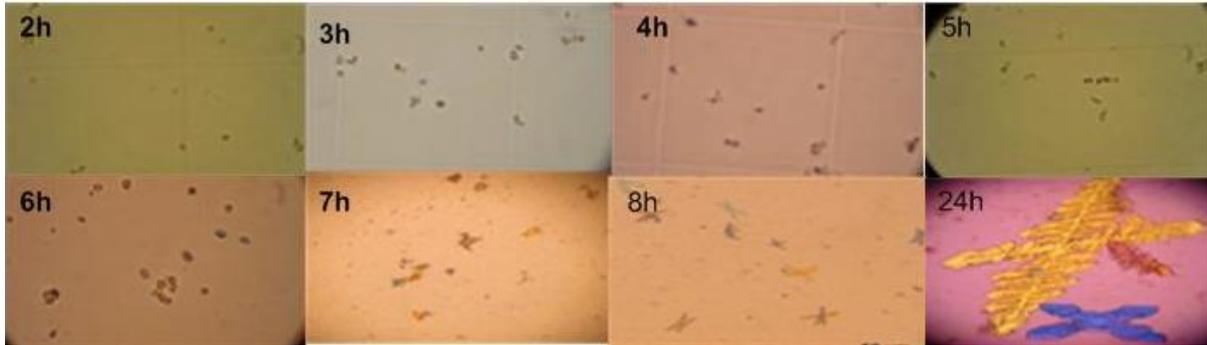
#### II.3.2.1. Caractérisation morphologique

Pour les souches bactériennes testées positivement dans la formation des cristaux de struvite, on a établi un protocole pour déterminer le temps d'incubation pour cinq souches correspondant au temps de formation des premiers cristaux. Il s'en est suivi de la cinétique de l'évolution des cristaux par microscopie à polarisation.

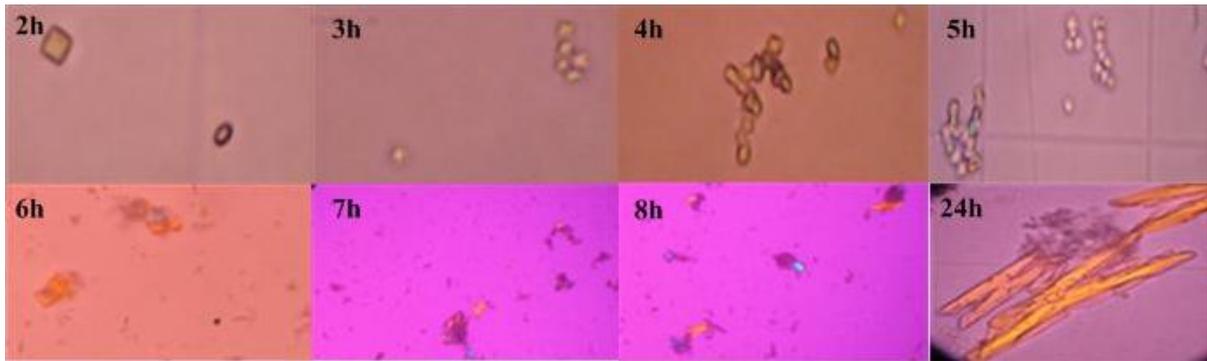
Pour la détermination du temps d'incubation, les urines synthétiques infectées ont été suivies par la mesure de la turbidité, la mesure du pH et l'analyse de la cristallurie chaque heure et cela par des intervalles de temps d'une heure. Ces mesures et analyses ont été prolongées au-delà des périodes d'incubations jusqu'à 24h pour mettre en évidence l'effet de chaque espèce bactérienne sur la croissance et la ségrégation des cristaux de struvite.

Les observations par microscopie à polarisation de l'évolution des cristaux dans les urines inoculées sont représentées dans les figures 26 à 30. Comme il a été indiqué, ces observations ont été effectuées à partir de 2 heures d'incubation avec un échelon de 1 heure jusqu'à 8 heure. Le temps de séjours a été prolongé jusqu'à 24 heure pour une dernière observation.

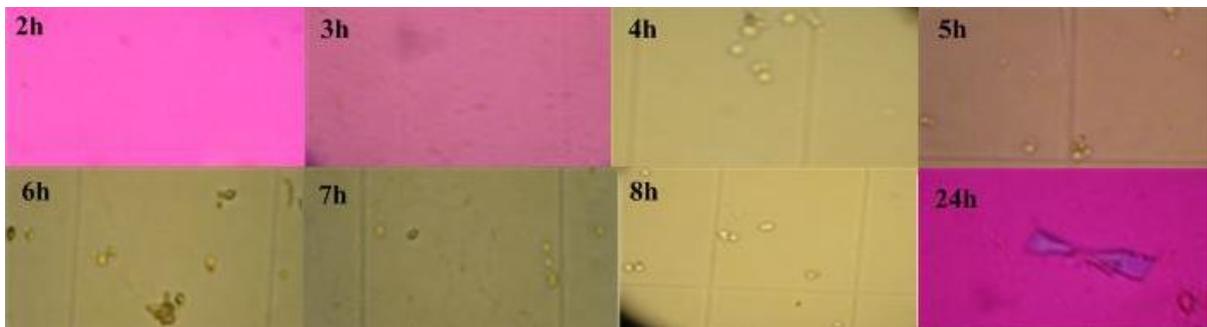
Aucune précipitation de struvite n'a été détectée dans les expériences de contrôle (avant 2 heures d'incubation) et les cristaux obtenus dans les différentes urines à différents stades, ont été analysés systématiquement par spectrophotométrie IRTF pour identifier leur nature.



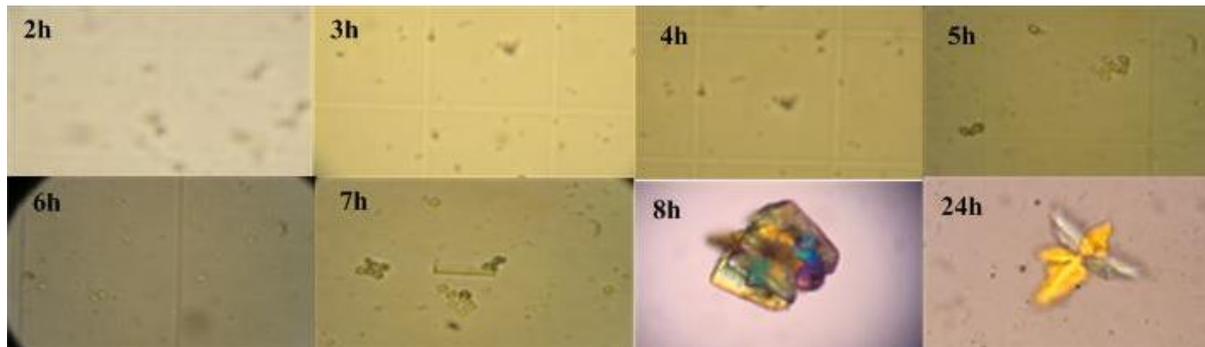
**Figure 30 :** Micrographie des cristaux de struvite induits par *Proteus mirabilis*



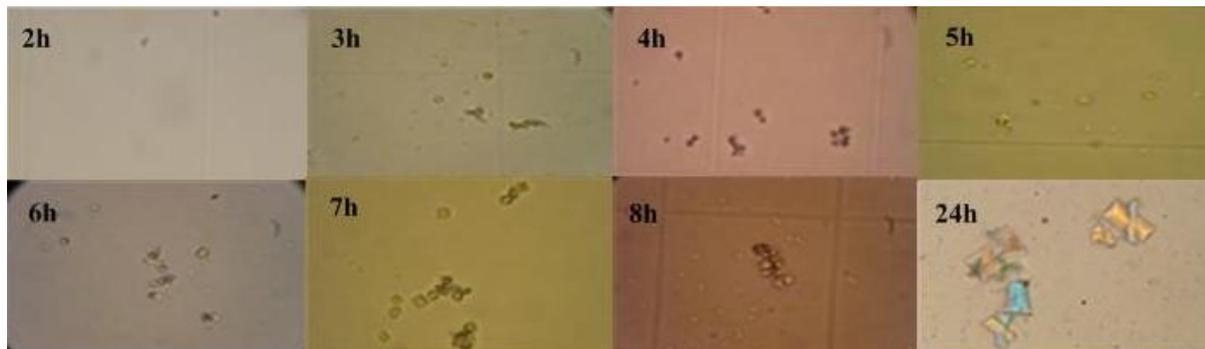
**Figure 31 :** Micrographie des cristaux de struvite induits par *Proteus vulgaris*



**Figure 32 :** Micrographie des cristaux de di-phosphocalcique induit par *Pseudomonas aeruginosa*



**Figure 33:** Micrographie des cristaux de struvite induits par *Klebsiella pneumoniae*



**Figure 34 :** Micrographie des cristaux de struvite induits par *Staphylococcus aureus*

Dans toutes les cultures, le volume cristallin des cristaux de struvite (taille et quantité) augmente avec le temps mais varie, cependant, d'une espèce à une autre. De ces observations, on note l'apparition des premiers cristaux à partir de 2h pour *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* avec une cinétique de germination (nouveau cristaux) et croissance assez rapide qui a permis de détecter les premiers cristaux de struvite en forme X dès 8 heures de séjours.

Pour ce qui est des autres bactéries *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, la cinétique de croissance semble respectivement d'autant plus tardive.

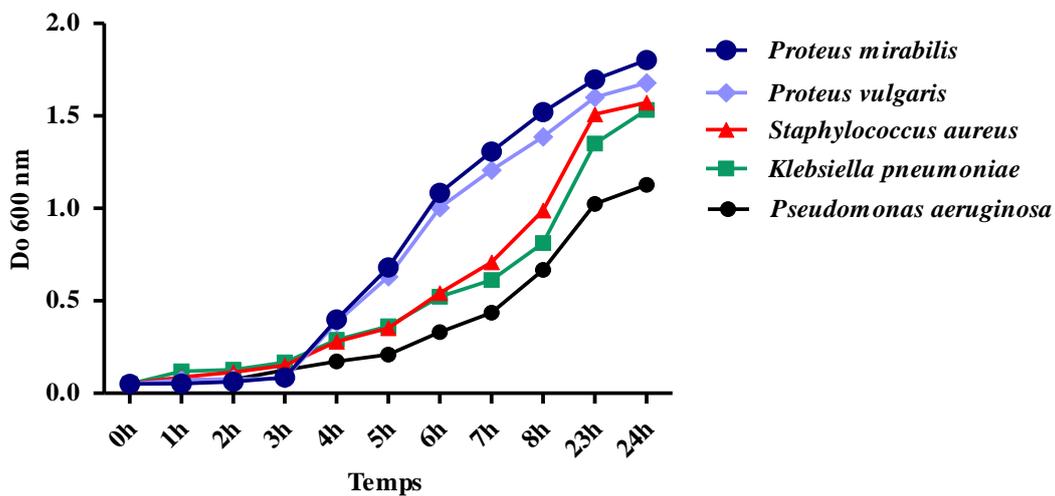
Les résultats présentés dans les figures 30 à 34 donnent une idée assez proche sur la cristallisation de la struvite in-vivo. Ce processus suggère une précipitation de struvite initiée au bord de la masse bactérienne, et dans peu de temps plus de cristaux sont formés pour finalement couvrir complètement la masse bactérienne (Sánchez-Román et al, 2007)

### II.3.2.2. Mesure de la turbidité:

Le modèle d'étude de la formation des cristaux que nous avons adopté est basé sur le principe de la turbidimétrie se référant sur la croissance cristalline qui comporte la nucléation,

la croissance et l'agrégation (Kavanagh, 1979). La turbidimétrie est une méthode optique qui mesure l'absorbance qui existe dans une solution.

Les résultats présentés dans la figure n° 35 montrent que les bactéries testées ont induit une augmentation de la densité optique par rapport au témoin, Elle varie considérablement d'une espèce à une autre de 1,1 à 1,8 comme une valeur maximum, après 24h d'incubation.



**Figure 35:** Turbidité due à la croissance cristalline induite par les souches bactériennes testées dans l'urine artificielle (mesurée à 600 nm)

A partir de ces courbes on constate un même profil de variation des valeurs de D.O pour l'ensemble des bactéries uréasiques testées. En effet, une première étape de 0 à 3 heures où l'évolution de la D.O est insignifiante ce qui se traduit par une turbidité faible liée à une absence de cristallisation ou à défaut une initiation de cristallisation (germination des cristaux) à faible retombées sur cette la turbidité. Une seconde étape de 8 à 23 heures où la croissance de la D.O est significative ce qui suppose une formation et une croissance conséquentes des cristaux. Finalement, une troisième étape au-delà de 23heures où les valeurs de la D.O semblent s'atténuer pour se stabiliser à des valeurs relativement élevées ce qui renseigne sur la fin du processus rapide de germination et croissance et l'installation du processus de ségrégation des cristaux.

A titre de comparaison on constate cependant, que la cinétique de formation et croissance cristalline pour *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* évolue selon un profil de D.O identique. Cette évolution présente les plus grandes valeurs de D.O au-delà de 3 heures au dépend des évolutions de la D.O des autres germes. Les plus faibles valeurs de D.O sont celles de

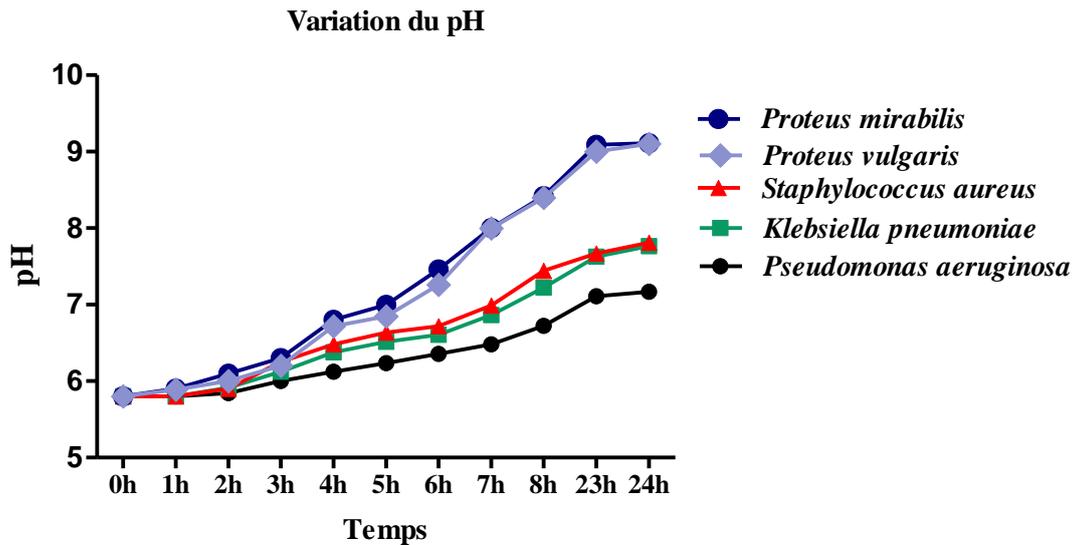
*Pseudomonas aeruginosa* alors que celles de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* présentent des valeurs de D.O moyennes en étant assez proches.

Ces variations révèlent le pouvoir et la cinétique de croissance des cristaux induits par des bactéries uréolytiques d'activité uréasique différentes. Cela laisse donc supposer que la production d'uréase par ces bactéries est responsable de la formation des cristaux et la comparaison des courbes de la D.O laisse aussi supposer que plus leur production est importante plus ce pouvoir est cette cinétique de cristallisation sont conséquents.

Pour ce qui est du témoin on note aucune variation de la D.O600 n'est enregistré confirment ainsi une absence totale du processus de cristallisation.

### II.3.2.3. Mesure du pH

La figure 36 montre les changements progressifs de pH avec une évolution également en trois étapes ; initialement lente et puis rapide pour finalement s'estomper progressivement. Les évolutions les plus significatives sont enregistrées pour *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* où le pH passe de 6 à 2 heures à 8,5 à 8 heures pour finalement atteindre une valeur de 9,1 à 24 heures. L'évolution du pH en présence de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* les valeurs ne sont pas aussi spectaculaires bien qu'elles culminent jusqu'à 7,8 à 24 heures. Finalement, c'est la solution inoculée avec *Pseudomonas aeruginosa* qui enregistre la plus faible augmentation du pH maximisée à 7,2 en fin d'expérimentation. A ce niveau il y a lieu de noter que l'uréase bactérienne de la décomposition des urines ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ) en deux types de molécules l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) induisant ainsi une augmentation du pH urinaire. De ce fait l'évolution du pH urinaire est un parfait indicateur de l'activité uréasique des bactéries. Comme dans le cas de l'évolution de la D.O les variations du pH convergent dans les mêmes interprétations.



**Figure 36** : Variation du pH en fonction du temps

### II.3.3 Analyse à spectrophotomètre infrarouge à transformer de Fourier (FTIR)

Tous les cristaux formés ont été récupérés et analysés en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à transformer de Fourier et les résultats obtenus ont montré que le principal composé des cristaux est le phosphate d'ammoniac-magnésien.

La caractérisation par analyse FTIR des cristaux récupérés dans chaque culture après un séjour 24 heures a été réalisée. La figure 37 montre le spectre FTIR obtenu mettant en évidence la nature des cristaux formés qui n'est autre que la struvite avec ces différents groupes fonctionnels. Le cristal de struvite contient du magnésium, de l'azote, de l'hydrogène, des groupes phosphate et de l'oxygène. Dans le spectre FTIR, les absorptions à  $3415,93 \text{ cm}^{-1}$  et  $698,23 \text{ cm}^{-1}$  montrent la présence de liaison N-H, tandis qu'à  $3124,68 \text{ cm}^{-1}$  indique la présence d'une liaison O-H dans l'échantillon. En raison de la présence des pics susmentionnés, il peut être confirmé que des groupes ammoniac et hydrates sont présents dans l'échantillon. Les bandes d'absorption situées à  $1007$ ,  $572$  et  $462 \text{ cm}^{-1}$  peuvent être attribuées à l'étirement antisymétrique  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_3$ ), à la courbure P-O ( $\nu_4$ ) et aux modes  $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ , respectivement. Les bandes d'absorption à  $1469$ ,  $1435$  et  $1400 \text{ cm}^{-1}$  peuvent être attribuées à la flexion antisymétrique de  $\text{NH}_4^+$  ( $\nu_4$ ). La liaison H eau-eau à  $761 \text{ cm}^{-1}$  et la liaison H ammonium-eau à  $892 \text{ cm}^{-1}$  peuvent également être reconnues à partir de ce spectre FTIR. Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus pour la struvite pure rapportés par [Banks et al. \(1975\)](#), confirmant ainsi que les produits minéralisés sont de la struvite.

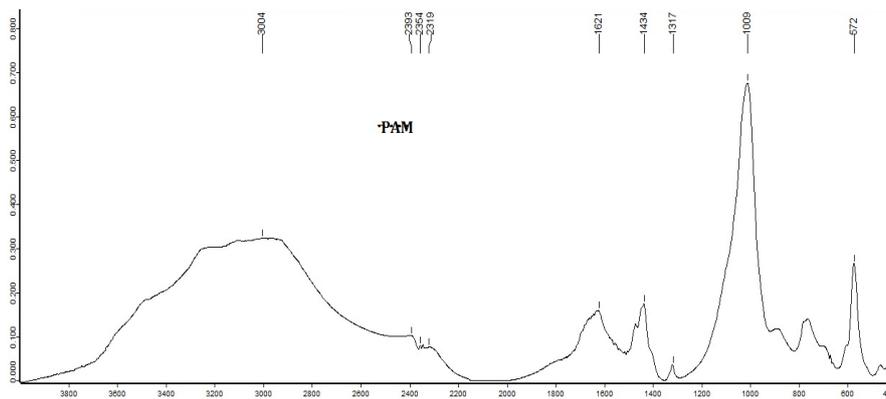


Figure 37 : spectres FTIR obtenu par l'analyse des cristaux de struvite

#### II.4. Discussion:

Les bactéries sont connues pour jouer un rôle important dans la formation des calculs rénaux pendant une longue période; Cependant, leur mode d'action exact a été une question de controverse (Daudon, 2012), Alors que les espèces qui ont la capacité d'hydrolyser l'urée peuvent jouer un rôle considérable dans la formation de calculs de struvite en modifiant l'environnement de sorte que les précipitations se produisent (Das et al, 2017).

Nous avons procédé à l'observation directe des cristaux formés par l'utilisation de microscope à polarisation pour cribler et identifier rapidement les composés cristallins formés dans l'urine synthétique. Ainsi, La cinétique de croissance des cristaux a été également suivie par microscopie à polarisation.

Au cours de ces études in vitro, on a mis en évidence que seules les bactéries ayant une activité uréasiques parmi les bactéries testées, dont les *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, ont une grande aptitude à former des cristaux d'infection de type struvite. Dans ce sens, Aucun cristal n'a pu être observé dans les urines infectées par *Escherichia coli*, d'activité uréasiques nulle, et dans les témoins d'urines artificielles stériles, ce qui confirme que seule l'activité uréasique, que possèdent certaines bactéries, est garante de la formation de ces résidus cristallins.

Dans la littérature on trouve que plusieurs chercheurs ont prouvé expérimentalement que la formation de calculs de struvite associée à une infection des voies urinaires causée par des bactéries productrices d'uréase telles que *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* et les espèces de *Staphylococcus* (Vermuelen et Goetz, 1954; Nemoy et Stamey, 1971; Griffith et al, 1976 et

1978; Fowler, 1984; McLean et al, 1985; Singh et Rai, 2014), reconnaissant ainsi le lien entre l'activité bactérienne et la formation de struvite. Dans un autre travail, Elliot et ses collaborateurs. (1958; 1959) ont prouvé que les inhibiteurs d'uréase peuvent prévenir la struvite due à l'uréase et à l'urée. Ils ont également rapporté que l'alcalinité induite par l'uréase ou l'hydroxyde d'ammonium conduit à la cristallisation de la struvite alors que l'alcalinité induite par l'hydroxyde de sodium conduit à la cristallisation de l'apatite.

Une expérience réalisée par Brown TR. (1901) a montré que l'urine infectée par *Proteus* et *Staphylococcus* était de nature alcaline et contenait une quantité accrue de protéines et de débris cellulaires. Il a conclu également que l'alcalinité et l'augmentation de l'ammoniac résultant de la division de l'urée dans l'urine peuvent conduire à des calculs de struvite et d'apatite carbonatée. Ces résultats ont été confirmés par la suite par d'autres scientifiques (Ritz et al, 2012; Gavin et al, 2016).

Kelly et al. (2007) et Follmer. (2010) ont montré que l'uréase était un déterminant critique de la virulence nécessaire à la colonisation par *Proteus mirabilis*, à la lithiase urinaire et à la pyélonéphrite aiguë sévère.

L'effet du pH sur la cristallisation de la struvite a été étudié par Pérez-García et al. (1989). La précipitation de la struvite par les bactéries a été réalisée dans la gamme de pH de 5 à 9. Cependant, la cristallisation a eu lieu à toutes les conditions de pH; les meilleurs résultats ont été obtenus dans la plage de pH de 7 à 8,4. Par conséquent, il a été conclu que le pH alcalin convenait à la formation de struvite.

Dans l'expérience de cristallisation réalisée par Zhu et al. (2012), *P. mirabilis* a induit une augmentation significative de la DO 600 à 5 et 6 h, ainsi qu'une augmentation de la valeur du pH de 3 à 6 h. De plus, Torzewska et Rozalski. (2014) ont montré que l'élévation du pH, pendant l'incubation des bactéries dans l'urine synthétique, dépend de l'activité uréasique. Par la suite, l'alcalinisation des milieux a résulté de l'ammonium libéré par la dégradation bactérienne de l'urée avec un pH croissant.

Dans cette étude, les variations morphologiques des cristaux de struvite peuvent dépendre du pH qui a joué un rôle important dans la précipitation des phosphates (Daudon, 2013; Manzoor et al, 2018) dont les souches bactériennes *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Staphylococcus aureus* ont formées des cristaux de phosphates ammoniaco-magnésien avec des urines de pH alcalin par contre *Pseudomonas aeruginosa* a

formé des cristaux de phosphates bi-calciques qui sont observés avec des urines faiblement acides peu acides ou proches de la neutralité (Balédent, 2019; Daudon, 2014).

Les études antérieures ont bien montré que les bactéries sont capables d'induire la précipitation de la struvite, conduisant à la cristallisation avec diverses habitudes de croissance. Cependant, les travaux pertinents impliquant la morphogénèse sont limités, ce qui entrave notre compréhension de la cristallisation de la struvite à médiation bactérienne.

McLean *et al.* (1990) ont rapporté que les cristaux induits par *Proteus mirabilis*, qui sont initialement observés sous la forme d'un précipité magnésium amorphe, puis d'un aspect dendritique ou en forme de X, tabulaire et trapézoïdal ou octaédrique, indiquant que le taux de croissance varie de rapide à très lent. Le matériel formé est semblable en structure à celui trouvé dans nos résultats obtenus par les *Proteus* dont des petits matériaux microcristallins sont apparus après seulement 2 h et à 8 h la forme des cristaux en X est bien révélée.

Prywer et Torzewska. (2012) ont rapporté que la majorité des monocristaux formés ont une forme typique de couvercle de cercueil et avec le temps et avec une augmentation supplémentaire du pH, de très grandes dendrites en forme de X apparaissent. Le pH égal à 7,2, nécessaire à la précipitation de la struvite, est atteint après 4 heures d'incubation.

Sadowski *et al.* (2014) ont découvert que la struvite obtenue à partir d'urine artificielle avec ou sans *Proteus mirabilis* présentait toutes deux une structure en forme de cercueil, mais que les faces cristallines exposées des deux cristaux étaient différentes, ce qui s'expliquait par des interactions électrostatiques entre des résidus chargés négativement des cellules bactériennes et des surfaces cristallines (Prywer et Olszynski, 2017).

En outre, la struvite en forme de X a également été observée à un pH élevé en présence de *Proteus mirabilis*, et les auteurs ont suggéré que le changement rapide de la valeur du pH causé par la souche joue un rôle principal dans la formation de cette caractéristique (Sadowski *et al.*, 2014).

Ils ont récemment montré que la souche *Shewanella oneidensis* MR-1 a dominé la formation de struvite en forme de cercueil (Li *et al.*, 2017).

Ces rapports corroborent avec les résultats obtenus dans cette étude, confirment également le rôle des espèces bactériennes testées dans la formation des calculs infectieux. Il est clair que le matériel microcristallin formé est dû à la présence de bactéries inoculées dans les urines artificielles. Dans ces circonstances, l'uréase, enzyme produite par les bactéries, divise l'urée

((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO), composant naturel de l'urine, en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et ammoniac (NH<sub>3</sub>). Ce dernier augmente le pH urinaire, ce qui entraîne une élévation de la concentration des ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Ces ions ainsi que les ions de magnésium Mg<sup>2+</sup> normalement présents dans l'urine conduisent à la cristallisation de la struvite, selon la réaction suivante :

$$\text{Mg}^{2+} + \text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-} + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$$
 (Abbona F et Boistelle R, 1979; Griffith, 1979; Bichler et al, 2002; Prywer and Torzewska, 2010). Par conséquent, il n'est pas possible de générer de la struvite dans l'urine en l'absence d'action de l'uréase car la concentration d'ammoniac est très faible dans des conditions normales. De plus, l'ammoniac libéré lors de l'hydrolyse de l'urée est capable d'endommager la couche de glycosaminoglycanes, qui protège la surface urothéliale contre l'infection bactérienne (McLean et Nicel. 1994).

Plusieurs travaux ont constaté que de nombreuses souches bactériennes provenant de différents habitats naturels sont capables d'induire la minéralisation de la struvite (Rivadeneira et al. 1992; Prywer et Torzewska. 2009 ; Sinha et al, 2014; Soares et al, 2014; Li et al, 2017; Luo et al, 2018; Simoes et al, 2018; Zhao et al, 2019).

Omar et al. (1998) ont également signalé la croissance de cristaux de struvite en présence de deux espèces bactériennes, à savoir les coralloïdes *M. Xanthus* et *Myxococcus*.

Récemment, Zhao et al. (2021) ont rapporté qu'un actinomycète *Microbacterium marinum* sp. nov. H207 pouvait induire la formation de struvite en forme de cercueil et trapézoïdal. Les expériences biomimétiques au cours du temps avec le surnageant ont témoigné que l'augmentation du pH et de la teneur en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> favorisait l'évolution des formes les plus communes des cristaux de struvite.

Rivadeneira et al. (1993) ont isolé 161 souches bactériennes aérobies du sol et de l'eau douce et ont découvert que plus de la moitié de ces souches avaient la capacité de produire des cristaux de struvite. En outre, Les bactéries anaérobies sulfato-réductrices (SRB) isolées des sédiments fluviaux et de la dolomie pourraient également minéraliser la struvite (Han et al, 2015 et 2016).

Les résultats obtenus dans cette expérimentation confirment la causalité entre l'activité uréasiques des bactéries et la formation des cristaux de struvite. Il se trouve que plus cette activité uréasique est importante plus le volume cristallin global (VCG) des cristaux est important. Cet aspect a été mis en évidence avec les différentes observations, analyses et mesures entreprises. En effet, d'après Griffith. (1978), les principales bactéries urinaires

productrices d'uréase sont dans l'ordre décroissant les *Proteus Vulgaris* et *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

## **II.5. Conclusion**

En conclusion, une série d'expériences in vitro, avec et sans bactéries, nous a permis de confirmer la corrélation entre le pouvoir de cristallisation de la struvite et l'activité uréasique de chaque espèce testées dont les bactéries uréasiques telles que *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* qui jouent un rôle majeur dans la morphogénèse spécifique de la struvite. Ces résultats démontrent également que les bactéries représentent un facteur de risque majeur de cristallogénèse de struvite conduisant par conséquence à la calculogénèse infectieuse.

# **Partie III**

*In vitro, évaluation de  
l'activité antilithiasique de  
l'extrait aqueux de *Fraxinus  
excelsior* L sur les cristaux de  
struvite*

### III.1. Introduction

L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de la lithiase de l'arbre urinaire en Algérie et notamment en Afrique, reste assez ancrée dans les pratiques populaires où elle constitue la principale base curative (Khitri et al, 2016). A travers cette optique, nous nous sommes fixés comme objectif l'évaluation des effets litholytique et inhibiteur d'une plante assez répandue dans le littoral Algérien, appelée *Fraxinus excelsior*, sur les cristaux du phosphate ammoniaco-magnésien (PAM) connu communément par Struvite (Neeraja Kamakshi et al, 2017; Kachru et al, 2016; Singh Baghel et al, 2021). De par son abondance, *F excelsior* est recensée parmi les plantes médicinales de la pharmacopée locale utilisée pour son effet litholytique (Eddouks et al, 2004). Cependant, aucune étude ne met en évidence son effet sur la lithiase d'infection qui est associée souvent à la formation de struvite. Ce type de lithiase est la conséquence d'infections persistantes et récurrentes de l'appareil urinaire (Salman et al, 2016). Elle est causée généralement par des microorganismes uréolytiques (Flannigan et al, 2014; Manzoor et al, 2018; Chauhan et al, 2009), dont les *Proteus mirabilis* est bien connu par sa capacité de produire l'uréase (Torzewska et Rozalski, 2014). Ce dernier transforme l'urée en ammoniaque et en dioxyde de carbone qui sont précurseurs de la formation respective de struvite et de carbapatite (Zalavadiya et al, 2013; Sujoy et Aparna, 2013; Kappaun et al, 2018). Ce processus s'accompagne par une alcalinisation des urines qui permet une stabilisation de ces composants (Rieu, 2005; Ramadevi et al, 2020; Geetha et al, 2010). Dans le contexte urolithique, la lithiase infectieuse est récidivante et difficile à traiter du fait que la croissance des cristaux de struvite et/ou de carbonate apatite se fait autours des micro-organismes et leur assurent ainsi une protection et au-delà une pérennisation de leur activité uréasique (Daudon et al, 2012). Dans ce sens, l'intérêt de l'aspect préventif pour traiter la lithiase d'infection et sa récurrence prend toute son ampleur et l'action, aussi bien litholytique qu'inhibitrice de croissance cristalline, de certaines plantes sur ce type de lithiase reste une éventualité intéressante.

### III.2. Matériel et méthodes

#### III.2.1. Matériel

##### III.2.1.1. Matériel végétal

La cueillette des feuilles de la plante *F excelsior* (Fig 38b) a été effectuée en mars 2018 au niveau de la région Seraïdi (Wilaya d'Annaba : Est Algérien). Cette plante a été identifiée par Docteur Mecheri R, Botaniste à Faculté de Médecine d'Annaba.

### III.2.1.2. Souche utilisées pour la cristallisation de la struvite

La souche *Proteus mirabilis* d'origine clinique proviennent de prélèvement d'une urine d'un patient lithiasique du service d'urologie du CHU Ibn Rochd Annaba (Voir partie pratique II).

## III.2.2. Méthodes

### III.2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux (E.Aq) est préparé en infusant 20 g de ces feuilles séchées dans 200 ml d'eau distillée bouillante pour une durée de 20 min. Le filtrat récupéré a été évaporé au rotavapeur de type BUCHI, R215 à 40 °C. Ainsi, l'E.Aq obtenu est placé dans un récipient hermétique puis conservé à 4 °C jusqu'à utilisation. Le rendement est calculé selon la formule suivante (Falleh et al, 2008 ; Spandana et al, 2018) :

$$R\% = (m/m_0).100$$

**R%** : rendement en pourcentage

**m** : masse en gramme de l'extrait sec récupéré après évaporation

**m<sub>0</sub>** : masse en gramme de matériel végétal de départ



**Figure 38** : Arbre (a) et Feuilles (b) de *Fraxinus excelsior* L.

### III.2.2.2. Dosage des polyphénols totaux

#### ✓ Principe

Le dosage des polyphénols se fait avec le réactif de Folin-Ciocalteu, qui en milieu alcalin se réduit en oxyde de tungstène et molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols.

**✓ Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols totaux dans l'extrait a été réalisé avec le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) selon la méthode décrite par [Slinkard et Singleton. \(1977\)](#). Ce dosage consiste à préparer une première solution constituée de 125 µl de l'E.Aq, de 500 µl d'eau distillée et de 125 µl de réactif FCR. Après 3 min on a additionné 1250 µl de carbonate de Sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 2 % et 1000 µl d'eau distillé et le mélange réactionnel ainsi obtenu a été mis en obscurité pendant 90 mn.

**✓ Lecture**

L'absorbance a été ensuite mesurée à une longueur d'onde de 760 nm avec un spectrophotomètre (DR2800 HACH LANGE). Le contenu en polyphénols totaux de l'E.Aq est exprimé en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG) par 1 gramme d'extrait.

**III.2.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux****✓ Principe**

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est basée sur la complexation avec  $\text{Al}^{+3}$ .

**✓ Mode opératoire**

La concentration des flavonoïdes totaux de l'E.Aq a été déterminée selon le protocole de [Türkgluet et al. \(2007\)](#). Un volume de 125 µl de l'E.Aq est dilué dans 2550 µl de méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), 100 µl d'une solution molaire d'acétate de potassium ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) et de 100µl de nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ) à 10 %.

**✓ Lecture**

Après 40 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 415 nm et la concentration totale en flavonoïdes a été exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine (EQ) par 1 g d'E.Aq.

**III.2.2.4. Test de dissolution des cristaux de struvite**

La cristallisation se produit après addition de la suspension de *P. mirabilis* dans 2ml de l'urine artificielle à une concentration appropriée de 0,5Mc Farland et incubation pendant 24h à 37°C. Un volume de 62,5µl d'E.Aq a été ensuite ajouté à différentes concentrations : 0,0625 ; 0,125; 0,25 ; 0,5 et 1 mg/ml. La suspension bactérienne dans l'urine synthétique sans E.Aq a été préparée comme témoin. Après 60min d'incubation, un examen par microscope à polarisation a été effectué pour comparer les résultats obtenus avec et sans la présence de l'E.Aq testé. La

mesure du pH de l'ensemble des échantillons a été effectuée en début et fin de l'expérimentation.

#### **III.2.2.5. Test d'Inhibition de la cristallisation de la struvite**

La synthèse chimique des cristaux de struvite dans les urines a été réalisée selon le protocole de [Sadki et Atmani \(2017\)](#), qui consiste à mélanger deux solutions de composition respective :

- A : potassium dihydrogène phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1M.
- B : chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ) 41g, chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 50g, 20ml d'hydroxyde d'ammonium complétée jusqu'à 50ml avec de l'eau bi-distillée, puis diluée 10 fois.

Le mélange de deux volumes de 1ml chacun de ces solutions a été interposé par l'ajout de 62,5 $\mu\text{l}$  de l'extrait de plante dans la solution A. L'E.Aq a été préparé à différentes concentrations : 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; et 1 mg/ml et la solution témoin a été préparée en remplaçant cet extrait par un volume égal d'eau distillée. Ainsi, après 30 min d'incubation à 37 °C, l'évolution de la cristallisation a été suivie au microscope à polarisation pour l'ensemble des mélanges.

#### **III.2.2.6. Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)**

Les observations micrographiques ont été suivies par l'analyse des cristaux formés par spectrophotométrie (FTIR). (Voir partie pratique I)

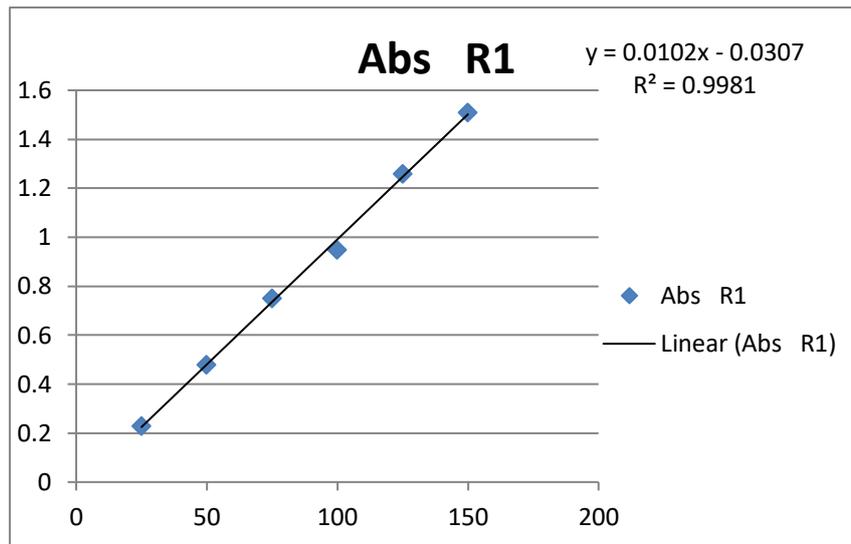
### **III.3. Résultats**

#### **III.3.1. Rendement de l'extraction**

La masse de substance végétale extraite de *F excelsior* récupérée après évaporation est de 3,33g ce qui correspond à un rendement d'extraction de 16,7%.

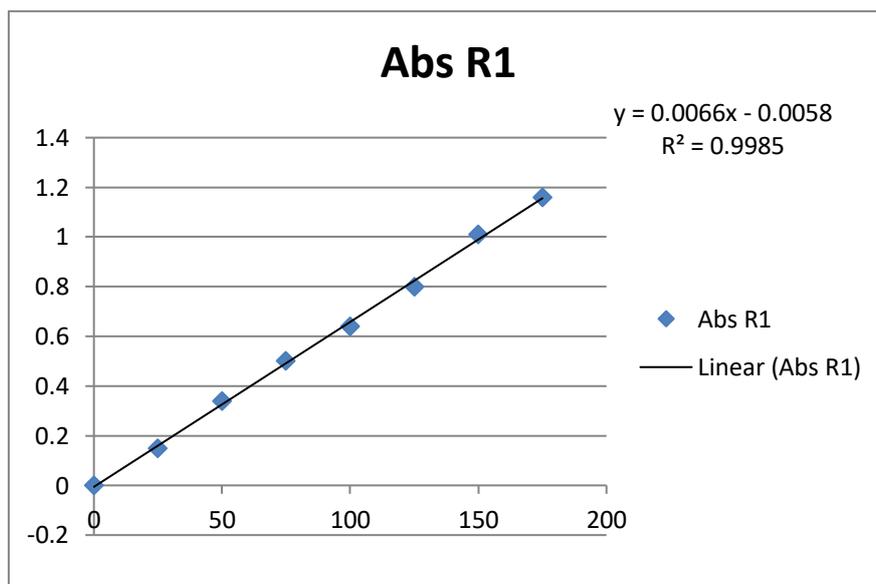
#### **III.3.2. Total de composés phénoliques et flavonoïdes**

La teneur en polyphénols totaux dans cet extrait dosé par le réactif de Folin-Ciocalteu est de  $60.92 \pm 0.94$  mg EAG/g d'extrait en se référant à la courbe d'étalonnage établie dans la figure 39.



**Figure 39:** Courbe d'étalonnage Acide gallique en µg/ml

Le résultat obtenu pour la concentration des flavonoïdes totaux exprimée en mg EQ/g de l'extrait est de  $19.32 \pm 0.75$  en se fondant sur la courbe d'étalonnage établie dans la figure 40.



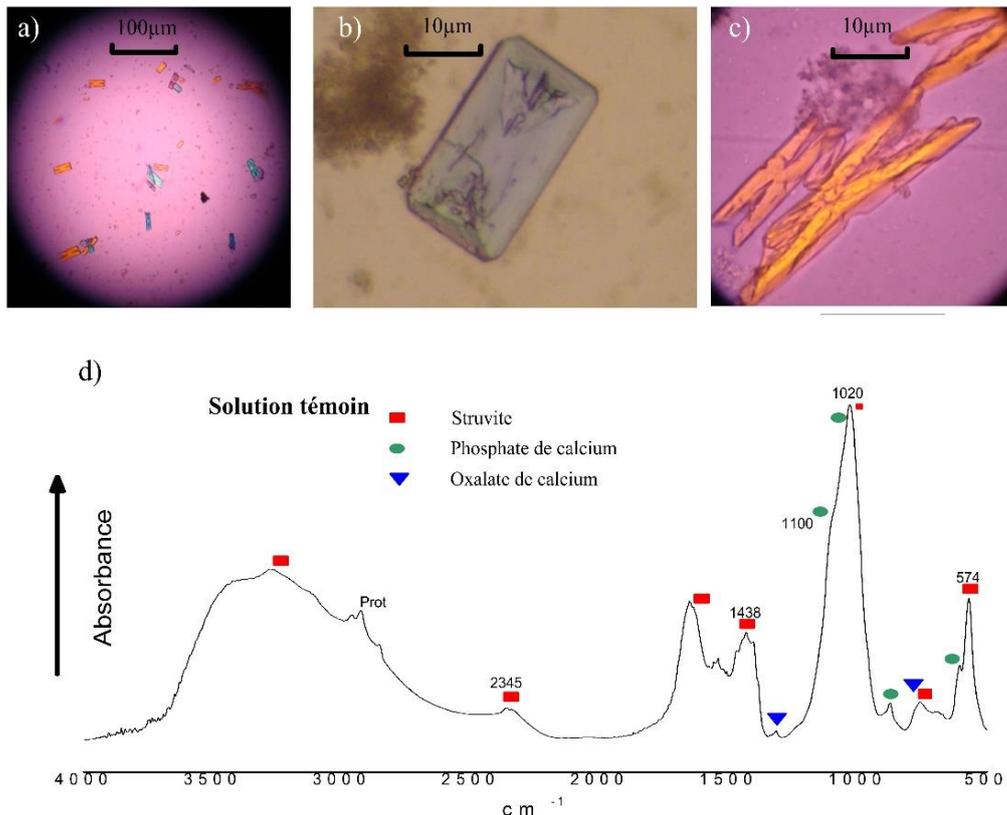
**Figure 40 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine en µg/ml

### III.3.3. Effet litholytique de *Fraxinus excelsior* sur les cristaux de struvite :

La figure (Fig 41 b, c) représente la formation des cristaux de struvite induite par synthèse biologique (présence de *P. mirabilis*) après 24 h à 37°C. Ces résultats montrent des cristaux à différents faciès typiques de la struvite dont la forme cercueil et la forme en X (Li et al, 2015).

En outre, on constate que le profil de ces facies est intact ce qui dénote des conditions de germination et croissance cristallines sans contraintes majeures.

Le dépouillement du spectre IRTF du culot urinaire, récupéré par centrifugation, a montré qu'il est formé essentiellement de struvite, confirmant ainsi la nature des cristaux observés, et à des quantités moindres, de phosphate apatite et d'oxalate de calcium (Fig 41 d).

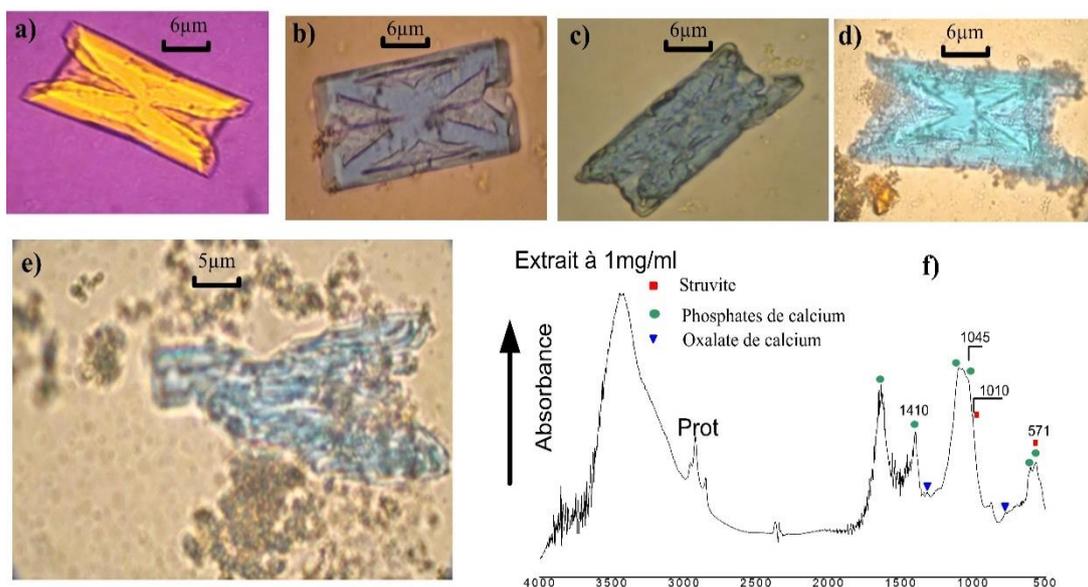


**Figure 41 :** Micrographies des cristaux de struvite induits par *Proteus mirabilis* après 24h à 37°C de la solution témoin (a-c) et leur analyse IRTF mettant en évidence leur nature et leur prédominance (d).

La figure 42 illustre l'effet litholytique de l'E.Aq pendant 60min, sur les cristaux de struvite préalablement induits par *Proteus mirabilis* après 24h à 37°C. En effet, les figures 42 a-b montrent que pour les faibles concentrations, les cristaux de struvite restent intacts (à 0,0625 mg/ml) ou faiblement dégradé (à 0,125 mg/ml). Au-delà de 0,25 mg/ml la dégradation des cristaux de struvite est d'autant plus accentuée avec l'augmentation de la concentration (Fig 42c, e). On observe aussi pour ces concentrations élevées que la dégradation de l'édifice

cristallin de struvite s'accompagne par l'apparition de granulation en phosphates de calcium (Fig 42 d, e).

Le spectre IRTF du résidu récupéré par ultracentrifugation à partir de la solution à 1 mg/ml de l'E.Aq (Fig 42f) révèle que la quantité de struvite s'est considérablement amoindrie relativement à celle des phosphates de calcium avec leur forme cristalline (Carbapatite) et amorphe (Phosphate amorphe de calcium carbonatée : PACC) qui prédominent. On note également dans les spectres IRTF des bandes d'absorbance des protéines en rapport avec la présence des bactéries inductrices de la formation des cristaux de struvite.



**Figure 42 :** Cristaux induits par *Proteus mirabilis* en présence de l'E.Aq de *F excelsior* à une concentration de 0,0625 (a) ; 0,125 (b) ; 0,25 (c) ; 0,5 (d) et 1 mg/ml (e) observés au microscope à polarisation et l'analyse IRTF (E.Aq à 1 mg/ml) mettant en évidence la nature des composants récoltés.

### III.3.4. Effet d'inhibition de la cristallisation de la struvite

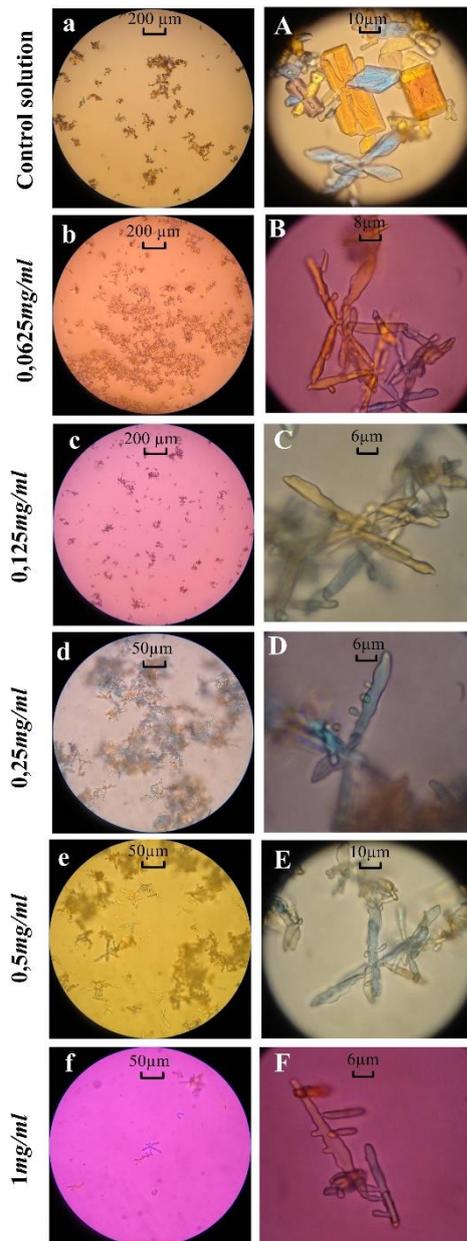
#### III.3.4.1. En absence d'inhibiteur

En termes de dénombrement, les cristaux formés en absence d'inhibiteur on a enregistré une forte densité cristalline (taille et nombre) (Fig 43a). Ces cristaux présentent des faciès caractéristiques de struvite (Fig 43A)

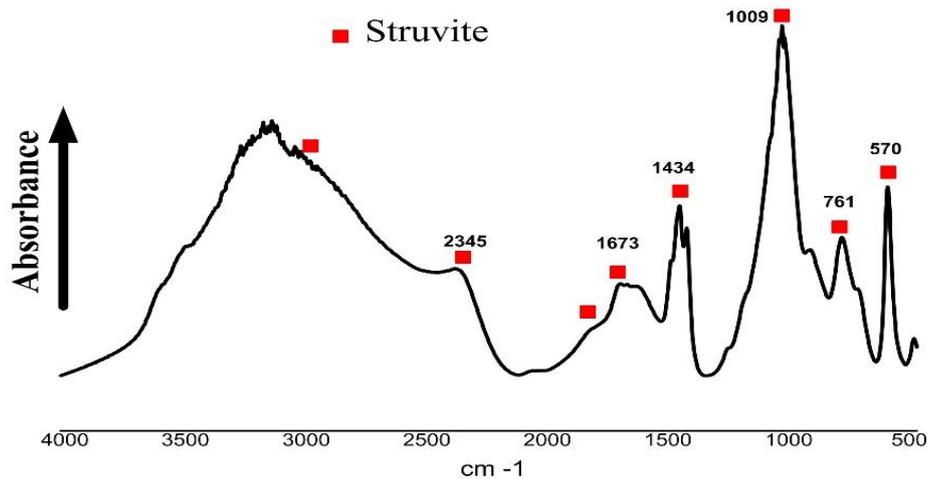
### III.3.4.2. En présence d'inhibiteur

Pour les concentrations faibles en E.Aq (de 0,065 à 0,25 mg/ml), la densité cristalline reste assez élevée (Fig 43b, c et d). Cette densité diminue considérablement pour les concentrations élevées (0,5 et 1 mg/ml) (Fig 43e, f).

Morphologiquement les cristaux obtenus se présentent en lamelles et agrégats de lamelles dont les arrêtes sont brisées et/ou courbées (Fig 43B, C, D, E et F). L'analyse IRTF a permis de constater que ces derniers sont des cristaux de struvite (Fig 44)



**Figure 43:** Evaluation de l'action inhibitrice en absence (a, A) et en présence de l'extrait aqueux de *Fraxinus excelsior* à une concentration de 0,0625 (b, B) ; 0,125 (c, C) ; 0,25 (d, D) ; 0,5 (e, E) et 1 mg/ml (f, F) observée au microscope à polarisation sur des cristaux de struvite synthétisés chimiquement.



**Figure 44** : Spectre IRTF des cristaux induits chimiquement en présence d'E.Aq de *Fraxinus excelsior* de 0,0625 mg/ml après 30 min d'incubation à 37°C

### III.4. Discussion

Traditionnellement, plusieurs plantes médicinales sont utilisées pour prévenir et traiter la lithiase urinaire (El Habbani *et al*, 2021; Madhu *et al*, 2012). Mais, il est difficile de déterminer le mécanisme exact dus aux principes bioactifs (Khokhlenkova *et al*, 2019). À cet égard, plusieurs auteurs ont évalué, in vitro, l'effet de différents extraits des plantes sur la formation des cristaux de struvite (Zhu *et al*, 2012; Chauhan et Joshi, 2013; Beghalia *et al*, 2014).

La présente étude a été entreprise pour évaluer in vitro les effets, litholytique et inhibiteur, de l'E.Aq de *F excelsior* (Oleaceae) vis-à-vis les cristaux de struvite. Pour ce faire, la cristallisation de la struvite a été induite selon deux processus : biologique, en présence de *Proteus mirabilis*, et chimique.

Dans l'approche biologique une incubation de 24h a permis de visualiser par microscopie à polarisation une population cristalline abondante composée principalement de cristaux de struvite qui se présentent sous différents faciès mais aussi en agrégats cristallins (Prywer et Torzewska, 2009). A ce niveau, il y a lieu de signaler que l'édifice cristallin de ces cristaux est intact et que par conséquent leur germination et croissance s'est effectuée sans contraintes majeures. L'analyse par spectrophotométrie IRTF du résidu urinaire récupéré révèle des bandes d'absorbance de la struvite mais également celles du phosphate de calcium (carbonate apatite), d'oxalate de calcium et de protéines (Jungers *et al*, 1989). Outre la struvite, la

formation des autres composants est justifiée par la présence, dans la composition des urines synthétiques, du chlorure de calcium dihydraté ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et du sodium d'oxalate ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) ayant induit respectivement la formation du carbonate apatite et de l'oxalate de calcium. La présence des protéines dans le culot urinaire analysé est directement liée à celle des bactéries.

L'ajout de l'E.Aq après cette incubation nous a permis d'observer, par microscopie à polarisation, une dégradation conséquente de l'édifice cristallin des cristaux de struvite à des concentrations  $\geq 0,5$  mg/ml en E.Aq. Cela dénote un effet litholytique probant de l'E.Aq de *F. excelsior* sur les cristaux de struvite pour des concentrations élevées. Dans ce contexte, ce résultat rejoint ceux obtenus par [Muryanto et al. \(2015\)](#) et [Chauhan et al. \(2009\)](#) pour l'extrait de feuilles d'*Orthosiphon aristatus* Bl.Miq et *Boerhaavia diffusa* Linn respectivement qui indiquent que ces derniers ont provoqué des défauts notables avec défragmentation des cristaux de struvite pour les fortes doses. Les fragments ainsi obtenus sont facile à être éliminés par voies urinaires.

L'analyse par spectrophotométrie IRTF du culot récupéré en présence de l'E.Aq fait apparaître une prédominance des bandes d'absorbance relatives au phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC) et à la carbapatite (CA) au dépend de celles de struvite ce qui confirme la dissolution de la struvite.

La struvite est une espèce cristalline pH dépendante, elle se développe dans un environnement alcalin et son traitement consiste à l'acidification de l'urine ([Scott et al, 2001](#)). D'après La mesure du pH, on a constaté que la formation des cristaux de struvite est accompagnée d'une alcalinisation du milieu urinaire qui résulte de l'activité uréasique des *Proteus mirabilis* ([Prywer et Torzewska, 2012](#)). Après l'ajout de l'E.Aq, et indépendamment des concentrations, le pH est resté assez élevé (pH = de 8,9 à 9,1), donc favorable à la stabilisation de la struvite, ce qui a prouvé que la dissolution observée peut être attribué à l'action de certains principes actifs présents dans l'extrait comme les polyphénols et les flavonoïdes qui sont connues par leur potentiel litholytique ([Mechraoui et al, 2021](#)).

La synthèse chimique de la struvite s'est caractérisée par une cinétique rapide où l'on a constaté, aussi bien en absence et en présence de l'E.Aq, la formation de cristaux de struvite juste après 30 min d'incubation. Ce résultat a été mis en évidence par les observations au microscope optique à polarisation et l'analyse par spectrophotométrique IRTF.

Le teste de cristallisation de struvite in vitro montre que le potentiel d'inhibition de la formation des cristaux de struvite est proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux testé, plus la concentration de l'extrait aqueux de *F excelsior* augmente plus la taille et le nombre de cristaux diminue. [Sadki et Atmani. \(2017\)](#) ont également rapporté une étude in vitro d'inhibition des cristaux de struvite en utilisant l'extrait aqueux d'*E. multiflora*. Les résultats ont révélé un effet inhibiteur similaire dont la dose 1 mg/ml de l'extrait aqueux testé induit une diminution de la taille et du nombre de cristaux formés à 40 % par rapport aux cristaux de tube témoin. De plus nos résultats ont prouvé un changement dans la morphologie cristalline, par conséquent, si on peut éviter la progression de la cristallisation de struvite, la lithiase infectieuse pourrait également être évitée.

L'effet inhibiteur de cristallisation de la struvite par supplémentation de l'E.Aq de *Fraxinus excelsior* s'est exprimé aussi bien morphologiquement que par le dénombrement des cristaux de struvite formés. En effet, pour l'ensemble des concentrations en E.Aq la morphologie des cristaux de struvite observées est assez particulière et se caractérise par une structure en lamelles et agrégats de lamelles à arrêtes et contours courbés. En outre, on a enregistré un nombre assez réduit de ces cristaux pour les concentrations de 0,5 et 1 mg/ml en l'E.Aq. A cet effet, on remarque qu'à faible concentration en l'E.Aq, la germination et la croissance des cristaux de struvite sont gouvernées par une cinétique assez rapide pour prendre le dessus sur l'effet inhibiteur de l'extrait. Ce dernier se manifeste par une modification remarquable de la morphologie de cristaux formés. A concentration élevée le potentiel inhibiteur de l'E.Aq est probant non seulement pour la modification de la morphologie des cristaux mais surtout pour une diminution conséquente de leur nombre.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté par [Kaleeswaran et al. \(2019\)](#) et [Reshma et al. \(2014\)](#), qui ont montré que les extraits de *Pedaliium murex* L et de *Scoparia Dulcis* ont exercé, en plus de l'effet litholytique, un effet inhibiteur de la cristallisation de struvite in vitro. Les composés phénoliques présents dans *Fraxinus excelsior* L peut être responsable de l'activité inhibitrice / litholytique vis à vis de la cristallisation de struvite ([Torzewska et Rozalski, 2014](#)).

Plusieurs études concernant les composés anti-cristallisation d'origine végétale vis-à-vis les cristaux de struvite ont des résultats fiables tels que les polyphénols, flavonoïdes. [Prywer et Torzewska. \(2012\)](#) ont signalé l'effet de la Curcumine, composé polyphénolique, contre *Proteus mirabilis* lors de la cristallisation de la struvite dans l'urine artificielle. Les résultats ont révélé qu'en présence de la curcumine, le temps d'induction des cristaux augmente, l'efficacité

de croissance de la struvite diminue et elle n'affecte pas la morphologie cristalline par rapport à l'absence de curcumine.

Torzewska et Rozalski. (2014) ont rapporté, in vitro, l'inhibition de la cristallisation par diverses substances phénoliques sur la formation de cristaux induite par *Proteus mirabilis*. Les résultats montrent que près de 50 % des substances testées empêchaient la formation des cristaux de struvite et inhibaient avec succès l'activité uréasique qui est la force motrice de la cristallisation de la struvite.

Jeyaleela et ses collaborateurs. (2019) ont confirmé le potentiel inhibiteur des flavonoïdes extraits des feuilles de *Melia dubia* sur les cristaux de struvite. Les résultats ont dévoilé que les flavonoïdes agissent sur l'uréase en inhibant cette dernière par la formation des liaisons hydrogènes et des interactions de van der Waals. En plus de ses effets directs sur l'uréase, les flavonoïdes ont inhibé la cristallisation, en déformant la surface cristalline des cristaux de struvite.

L'analyse de la composition chimique de l'E.Aq de *F excelsior* montre qu'il contient une quantité importante de polyphénols et de flavonoïdes, ce qui insinue la formation d'un complexe cristal-principe actif; les complexes formés seraient beaucoup plus solubles que les cristaux lui-même.

Ces essais in vitro montrent que l'E.Aq de *F excelsior* est efficace dans la dissolution et l'inhibition de la cristallisation. La prévention contre la lithiase d'infection repose principalement sur l'inhibition de la croissance cristalline et la dissolution des cristaux de struvite.

### III.5. Conclusion

Cette étude a apporté quelques preuves de l'utilisation traditionnelle de l'E.Aq de *F excelsior* dans la lithiase d'infection. On constate que l'effet litholytique/inhibiteur de l'extrait aqueux de *Fraxinus excelsior* vis-à-vis les cristaux de struvite est efficace. Néanmoins, il est très intéressant de tester cette plante dans un modèle in vivo pour certifier et recommander cette performance qui peut être d'un intérêt fondamentale pour la phytothérapie de la lithiase infectieuse.

# **Partie IV**

***In vitro, évaluation de  
l'activité antibactérienne  
de l'extrait aqueux de  
Fraxinus excelsior L***

## IV.1. Introduction

L'infection de l'arbre urinaire est l'une des maladies infectieuses les plus courantes dans toutes les tranches d'âge, elle est commune chez les hommes et les femmes. L'infection urinaire se définit comme la présence de bactéries dans les voies urinaires (Ali et al, 2014; Al-Jebouri et Atalah, 2012). Elle peut provenir dans n'importe quelle partie de l'appareil urinaire, dans les voies urinaires supérieures telle que les reins sous forme de pyélonéphrite (L'huillier et al, 2019) et peut atteindre la circulation sanguine à partir de ce site, provoquant un urosepsis potentiellement mortelle, ou bien dans les voies urinaires inférieures, telle que la vessie sous forme de cystite (Gupta et al, 2011). Elle est un facteur de risque crucial de lithogénèse et peut également aggraver les maladies rénales (Netelenbos et al, 2005; Kukreja et al, 2003).

Plus de 200 espèces bactériennes sont responsables d'infections urinaires et utilisent l'urée comme source d'azote ce qui conduit à la formation de struvite (Bouabdelli et al, 2012; Kaleeswaran et al, 2018). Cette dernière est un calcul grave à cause de la morbidité infectieuse et néphrologique qu'ils conduisent (Bruyere et al, 2008).

Les principales espèces responsables d'infections urinaires ainsi qu'à la formation de cristaux de struvite sont les espèces *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylocoques*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Serratia*, certains *hemophilus*, *Corynebacterium* du groupe D2, *Ureaplasma urealyticum*, et certaines souches d'*E. coli* (Lerner et al, 1989; Rivadeneyra et al, 1999; Bruyerea et al, 2008).

L'espèce *Proteus mirabilis* est la principale cause de formation de calculs urinaires (Coker et al, 2000). Elle est notamment collante aux cellules épithéliales rénales et elle résiste à de nombreux antibiotiques. Elle participe à la genèse et au développement de struvite. Cette formation est liée à l'activité uréasique bactérienne. Ce type de calcul résulte d'une sursaturation des urines en magnésium, ammonium, phosphate et carbonate. D'autres bactéries ne produisant pas d'uréase comme *E. coli* pourraient favoriser la précipitation des cristaux de phosphate de calcium (Garg et al, 2011). *E. coli*, comme *Proteus*, est capable de détériorer la surface de l'épithélium engendrant ainsi une réaction inflammatoire et l'adhérence des bactéries et des cristaux aux membranes (Polito et al, 1987; Hedelin et al, 1993).

Le traitement des infections bactériennes dépend principalement de l'utilisation des antibiotiques dont leur utilité clinique reste limitée à propos de leur consommation à long terme en raison d'effets secondaires ou d'une résistance bactérienne de haut niveau aux antibiotiques. Le traitement actuel le plus fréquemment prescrit pour la prévention de la lithiase d'infection

est le chlorure d'ammonium, l'acide acétohydroxamique (Thomas et Tolley *et al*, 2008), qui est également complété par des anti-inflammatoires non stéroïdiens et un traitement d'antibiotique. Toutefois, les effets secondaires potentiels de l'acide acétohydroxamique ne peuvent être négligés (Das *et al*, 2017). Néanmoins, le calcul urinaire peut protéger l'infection dont la stérilisation des urines par antibiothérapie est impossible (Daudon *et al*, 1993; McClean *et al*, 1985). En outre, même en présence d'antibiotiques, les bactéries peuvent adhérer, coloniser et survivre sur les dispositifs médicaux implantés telles que les cathéters urinaires et les surfaces de stent urétéral (Tenke *et al*, 2006). En effet, les infections urinaires récurrentes doivent recevoir un traitement supplémentaire pour prévenir les lésions rénales et la formation des calculs rénaux en particulier la struvite. Par conséquent, une thérapie alternative sûre et efficace doit être nécessaire pour la prévention du calcul de struvite par des plantes médicinales, qui semble être considérablement augmenté ces dernières années. Des études antérieures ont suggéré que les extraits aqueux de plantes utilisées en médecine allopathique sont des sources potentielles antibactériens (Vlietinck *et al*, 1995; Nair *et al*, 2005)

De point de vue scientifique, en plus de l'activité inhibitrice/litholytique des cristaux de struvite qui a été montré dans le chapitre précédent, l'extrait aqueux des feuilles de *Fraxinus excelsior* peuvent avoir une autre valeur potentielle dans la prévention de la formation de calculs de struvite par leur activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries responsables de cette affection. Dans ce chapitre, nous évaluons l'effet antimicrobien de l'E.Aq de *F excelsior*, in vitro, sur des souches bactériennes isolées chez des lithiasiques.

## IV.2. Matériel et méthodes

### IV.2.1. Matériel

#### IV.2.1. Matériel végétal

Notre travail a porté sur l'extrait aqueux de la plante médicinale *Fraxinus excelsior* à différente concertation.

#### IV.2.2. Souches bactériennes étudiées

Notre étude bactériologique a porté sur un total de 20 souches bactériennes qui nous ont servi pour accomplir nos expériences au niveau du laboratoire du département de biochimie de la faculté des sciences, université Badji Mokhtar Annaba, durant la période du mois de Novembre 2018 au mois d'Mai 2019.

- 08 souches de références délivrées par l'institut Pasteur d'Alger; *Escherichia coli* ATCC8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus albus* ATCC 8799, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300lhyh

- 12 souches d'origine clinique proviennent de prélèvements des urines de patients atteints de lithiase infectieuse du service d'urologie du CHU Ibn Rochd Annaba; 03 souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, 03 souches de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, 03 souches *Staphylococcus aureus*.

#### IV.2.3. Conservation des souches

Les souches bactériennes testées sont conservées à 5 °C dans des tubes contenant de GN incliné. (Voir la partie pratique II)

#### IV.2.4. Antibiotique

Le choix de l'antibiotique s'est porté sur la gentamicine à une charge de 40 mg/ml vu qu'il possède un large spectre d'action, à la fois agissant sur les bacilles à **Gram -** et sur les cocci à **Gram +**, déterminant ainsi la sensibilité de toutes les souches bactériennes testées.

### IV.3. Méthodes

La purification des souches et l'identification biochimique ont été effectuées dans le cadre d'un mémoire de fin d'étude en master spécialité microbiologie niveau du laboratoire de microbiologie appliquée université Badji Mokhtar Annaba.

#### IV.3.1. Test du pouvoir antibactérien

Nous avons testé le potentiel antibactérien de l'E.Aq des feuilles de *Fraxinus excelsior* par deux méthodes :

##### IV.3.1.1. Méthode de diffusion en disque

###### ✓ Principe

Cette technique est inspirée de celle de l'antibiogramme, elle repose sur la diffusion de l'extrait végétal à effet antibactérien sur disque en milieu solide dans une boîte de Pétri, après un certain temps de contact entre l'extrait et la bactérie cible (Dayal et Purohit, 1971). L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition.

**✓ Mode opératoire**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été procédée selon la technique de diffusion sur disques en milieu gélosé décrite par [Gulluce et al. \(2007\)](#) avec de légères modifications.

**- Préparation des disques**

- A l'aide d'un emporte-pièce, des disques de 6 mm de diamètre de papier wattman N° 40 sont fabriqués.
- Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai stérile pour autoclavage.

**- Préparation de l'inoculum**

- A partir d'une culture jeune de 18h, sur gélose nutritive, prélever à l'aide d'une anse de platine quelques colonies isolées et parfaitement identiques de chacune des souches bactériennes à étudier, les introduire dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex.
- Vérifier son opacité qui doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm dans le spectrophotomètre.

**- Préparation de de l'extrait aqueux :**

Les concentrations testées sont : 50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml et de 200mg/ml ([Ghedadba et al, 2015](#)).

**- Ensemencement**

- La gélose Mueller Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé aseptiquement en boîte de Pétri à raison de 15 ml.
- Après solidification, la surface de la gélose estensemencée par écouvillonnage avec l'inoculum préparé.
- Un disque imprégné de l'eau distillée testé comme contrôle négatif.
- Un disque imprégné de la gentamycine à 40 mg/ml (antibiotique de référence) est déposé à la surface de la boîte de Pétri (qui servira de contrôle positif).
- Des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre stériles sont placés à l'aide d'une pince bactériologique stérile à la surface de la gélose, et imprégnés de 10 µl de la solution à tester de l'extrait aqueux préalablement préparé.
- Incuber à 37°C pendant 24h à 48h.

**✓ Lecture**

La lecture des résultats se fait par la mesure de la valeur des diamètres d'inhibition qui sont représentées par une auréole formées autour des disques où aucune croissance n'est observée.

Tous les tests de l'expérimentation sont effectués en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne de trois essais.

**IV.3.1.2. Méthode de microdilution****✓ Principe**

Cette méthode compte sur la dispersion de l'agent antimicrobien à différentes concentrations de façon homogène et stable dans le milieu de cultureensemencé par du isolat testé. Elle se base sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches bactériennes vis-à-vis l'antimicrobien à étudier. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en antimicrobien capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible à l'œil nu (Allegrini et al, 1973).

La technique de dilution en bouillon est effectuée sur des plaques (Elisa à 96 puits) contenant des conteneurs avec des volumes identiques de bouillon nutritif inoculé par des souches bactériennes à tester contre des concentrations variables de l'extrait aqueux de *Fraxinus excelsior* (El Kalamouni, 2010).

**✓ Mode opératoire :**

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits aqueux contre les souches bactériennes testées sont déterminées par la méthode de microdilution. Les CMI sont étudiées pour les mêmes souches qui ont été testées dans l'essai de diffusion sur disque (Gulluce et al, 2007).

**- Préparation de l'inoculum**

- L'inoculum est préparé de la même façon que celles décrites précédemment pour la méthode de diffusion en disque.

**-Préparation de la gamme d'extraits et inoculation de la microplaque :**

- Une gamme de concentration de l'extrait dans l'eau distillée a été réalisée avec des dilutions en progression géométrique à raison de 2 dans des tubes stériles pour aboutir à des concentrations allant de 0,78 à 100 mg/ml.

- Les premiers puits contenant 195 µl de Bouillon Mueller Hinton (MHB) sans extrait aqueux et 5 µl de l'inoculum, qui a servi de témoin négatif.
- Les deuxièmes puits contenant 100 µl de MHB et 100 µl des extraits aqueux sans inoculum qui a servi de témoin positif.
- Les troisièmes puits contenant 200 µl de MHB.
- A partir des cinquièmes puits, répartir 95 µl de MHB stérile par puits sur les lignes A, B, C, D, E, F, G et H et 5µl de l'inoculum auparavant préparé.
- 100 µl de la solution mère de l'extrait aqueux initialement préparée d'une concentration égale à 100 mg/ml sont ajoutés dans les cinquièmes puits.
- 100 µl de chaque dilution sont transférés dans les puits consécutifs.
- 200 µl est le volume final dans chaque puits.
- Les plaques sont bien couvertes avec du parafilm stérile et puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.
- Pour déterminer les concentrations minimales bactéricides (CMB), prélever 100 µl de chaque puits qui ne montre pas une croissance bactérienne et l'ensemencer sur GN dans des boîtes de Pétri ensuite les incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

#### ✓ Lecture

- La présence d'un "culot" blanc sur le fond du puits indique la croissance bactérienne. De façon à indiquer la croissance microbienne, 10 µl de rouge phénol à 0,1% sont ajoutés aux puits et incubés à 37 °C pendant 30 min. Le rouge phénol agit comme un accepteur d'électrons dont leur couleur jaune-orange réduite en un produit rouge par les organismes biologiquement actifs (bactéries viables) (Cai *et al.*, 2014).
- La CMI est repérée par le puit qui contient la plus basse concentration de l'extrait aqueux testé où il y'a absence totale de croissance bactérienne et qui montre aucun changement de couleur.
- La CMB s'interprète comme la plus faible concentration de l'extrait aqueux, qui a manifesté un liquide clair sans le développement de la turbidité et sans prolifération bactérienne visible sur la boîte de Pétri.

- Le rapport CMB/CMI permet de déterminer le pouvoir antibiotique de l'extrait aqueux testé. L'extrait est bactéricide lorsque le rapport est inférieur ou égal à 4, et lorsqu'il est supérieur à 4 on dit que l'extrait est qualifié de bactériostatique (Joubert et al, 1958).

Tous les tests sont effectués en duplicata.

## IV.4. Résultats

### IV.4.1. La sensibilité à l'antibiotique testé

Nous avons comparé la sensibilité des souches testées à la gentamicine par la méthode standard des disques. Les mesures des diamètres des zones d'inhibition illustrant dans le tableau ci-dessus, montrent que toutes les souches testées sont sensibles à la gentamicine, à l'exception de la souche *Pseudomonas aeruginosa* isolée d'un patient lithiasique présente une multi-résistance du fait de l'absence d'une zone d'inhibition par la gentamycine.

### IV.4.2. Le pouvoir antibactérien de l'E.Aq de *Fraxinus excelsior* par la méthode de diffusion en disque et la méthode de microdilution

L'effet antibactérien de l'E.Aq de la plante *Fraxinus excelsior* (extrait de frêne) sur les souches testées est expérimenté par la méthode des disques et la méthode de microdilution. Leur pouvoir antibactérien est quantitativement et qualitativement estimé par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques et la détermination des valeurs de CMI en exposant les souches bactériennes testées à différentes concentrations de l'E.Aq étudié.

Les résultats du test de diffusion sur disque se traduisent comme suite:

- (-) : Pas sensible pour un diamètre inférieur ou égal à 8,0 mm;
- (+) : Moyennement sensible pour des diamètres entre 8,0 et 14,0 mm;
- (++) : Sensible pour les valeurs 14,0 à 20 mm;
- (+++) : Très sensible pour les valeurs égale ou supérieur à 20 mm ;

Suivant les valeurs de la CMI exprimé en (mg/ml), la lecture des résultats est appréciée comme suite:

- (-) : Pas sensible pour les valeurs de 50,0 à 25,0 mg/ml,
- (+) : moyennement sensible pour les valeurs de 12,5 à 3,0 mg/ml,
- (++) : Sensible pour les valeurs de 2 à 0,4 mg/ml
- (+++) : Très sensible pour les valeurs égale ou inférieure à 0,2 mg/ml (Djabou et al, 2013).

Les résultats obtenus par la méthode des disques et la méthode de la microdilution de l'E.Aq de la plante *Fraxinus excelsior* sont enregistrés dans le tableau 12 (Annexe 4).

**Tableau 12 :** Activité antibactérienne de l'E.Aq de *F excelsior* vis-à-vis les souches bactériennes testées

<i>Souches testées</i>	DI <sup>a</sup>	DI <sup>b</sup>	DI <sup>c</sup>	DI <sup>d</sup>	CMI	CMB	CMB / CM1	CN
<b>Bacilles à Gram -</b>								
<i>Escherichia coli</i> 1	8,8 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	9,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	10,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,5 <sup>(+)</sup>	12,5	1	25
<i>Escherichia coli</i> 2	8,8 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	9,1 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	10,1 ± 0,4 <sup>(+)</sup>	10,8 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	6,25 <sup>(+)</sup>	6,25	1	23
<i>Escherichia coli</i> 3	8,8 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	10,5 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	11 <sup>(+)</sup>	6,25 <sup>(+)</sup>	6,25	1	24
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	8,8 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	9,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,3 ± 0,8 <sup>(+)</sup>	25 <sup>(-)</sup>	25	1	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	8,8 ± 0,4 <sup>(+)</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	12,5 <sup>(+)</sup>	12,5	1	28
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	9,1 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	9,8 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	12 <sup>(+)</sup>	25 <sup>(-)</sup>	25	1	26
<i>Proteus mirabilis</i> 1	9,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	10 ± 0,5 <sup>(+)</sup>	11,8 ± 0,4 <sup>(+)</sup>	12,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	6,25 <sup>(+)</sup>	6,25	1	31
<i>Proteus mirabilis</i> 2	9 <sup>(+)</sup>	9,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	10,5 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	12,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	3,12 <sup>(+)</sup>	3,12	1	32
<i>Proteus mirabilis</i> 3	9,1 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	10 ± 0,5 <sup>(+)</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,5 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	3,12 <sup>(+)</sup>	3,12	1	23
<i>Proteus vulgaris</i>	9 <sup>(+)</sup>	9,5 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	10,6 ± 0,8 <sup>(+)</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,5 <sup>(+)</sup>	12,5	1	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9,1 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	10,5 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	11 ± 0,5 <sup>(+)</sup>	12 <sup>(+)</sup>	6,25 <sup>(+)</sup>	6,25	1	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 <sup>(-)</sup>	6 <sup>(-)</sup>	6 <sup>(-)</sup>	6 <sup>(-)</sup>	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	9 ± 0,5 <sup>(+)</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	10 <sup>(+)</sup>	10,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,5 <sup>(+)</sup>	12,5	1	25
<b>Coccis à Gram +</b>								
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	9 <sup>(+)</sup>	9,5 <sup>(+)</sup>	10,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,5 ± 0,5 <sup>(+)</sup>	1,56 <sup>(++)</sup>	3,12	2	30
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	10,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	14,1 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	12,5 <sup>(+)</sup>	12,5	1	29
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	9,5 ± 0,2 <sup>(+)</sup>	10,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	11,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	12,5 <sup>(+)</sup>	12,5	1	28
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	9,1 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	9,5 ± 0,5 <sup>(+)</sup>	10 ± 0,5 <sup>(+)</sup>	11,6 ± 0,6 <sup>(+)</sup>	6,25 <sup>(+)</sup>	6,25	1	28
<i>Staphylococcus albus</i> ATCC 8799	9 <sup>(+)</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	10,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	11,6 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	3,12 <sup>(+)</sup>	3,12	1	29
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	9 <sup>(+)</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>(+)</sup>	10 <sup>(+)</sup>	11,6 ± 0,8 <sup>(+)</sup>	6,25 <sup>(+)</sup>	6,25	1	29
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	9 <sup>(+)</sup>	10,6 ± 0,6 <sup>(+)</sup>	12,6 ± 0,1 <sup>(+)</sup>	14 ± 1 <sup>(+)</sup>	25 <sup>(-)</sup>	25	1	26

DI<sup>a</sup> = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné de l'E.Aq à 50mg/ml

DI<sup>b</sup> = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné de l'E.Aq à 100mg/ml

DI<sup>c</sup> = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné de l'E.Aq à 150mg/ml

DI<sup>d</sup> = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné de l'E.Aq à 200mg/ml

CN = La gentamicine à 40mg/ml

(Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD)

Les résultats de la méthode des disques et de la microdilution de l'E.Aq de *F excelsior* sont regroupés dans le tableau n° 12. D'après les valeurs enregistrées, l'E.Aq de *F excelsior* affiche une activité inhibitrice remarquable sur les isolats testés, De même, elle est dose-dépendante et résulter de type des souches bactériennes.

Les valeurs obtenues indiquent que l'E.Aq de de *F excelsior* exhibe un effet antimicrobien important vis-à-vis les souches : *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Escherichia coli* 3, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* 2, *Proteus mirabilis* 3, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* 2, *Staphylococcus aureus* 3, *Staphylococcus albus* ATCC 8799, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC25923. On note que *Pseudomonas aeruginosa* est la seule souche bactérienne résistante du fait de l'absence d'une zone d'inhibition au tour des disques imprégnés aux E.Aq testés.

Chez les bacilles à Gram -, les diamètres de la zone inhibitrice (DI) varient entre  $8,8 \pm 0,1$  mm et  $12,6 \pm 0,3$  mm. Les 03 souches de *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli* ATCC8739 sont les bactéries les plus sensibles à l'E.Aq avec des DI de  $12,6 \pm 0,3$  et  $12,3 \pm 0,8$  mm respectivement, suivi par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (DI = 12 mm) et *Proteus vulgaris* (DI =  $11,3 \pm 0,3$  mm). Les valeurs de CMI les plus élevées sont 3,12 mg/ml pour les souches *Proteus mirabilis* 1, *Proteus mirabilis* 2 et 6,25 mg/ml pour les souches *Escherichia coli* 2, *Escherichia coli* 3, *Proteus mirabilis* 1 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les cocci à Gram + sont les bactéries les plus sensibles dont les DI varient entre 9 mm (pour les ATCC) et  $14 \pm 1$  mm (*Staphylococcus aureus* 1). Cependant, les valeurs DI les plus larges sont  $14,1 \pm 0,1$  mm et  $14 \pm 1$  mm pour *Staphylococcus aureus* 1, *Staphylococcus aureus* ATCC43300 respectivement, suivi par *Staphylococcus aureus* 2 (DI =  $12,6 \pm 0,3$  mm) et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ( $12,5 \pm 0,5$  mm). Les valeurs de CMI les plus intenses sont 1,56 mg/ml pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et 3,12 mg/ml pour *Staphylococcus albus* ATCC 8799, ce qui montre donc que l'E.Aq de *Fraxinus excelsior* est efficaces sur les bactéries testées à faible dose.

Afin de déterminer la nature de l'activité antimicrobienne, 100 µl de chaque échantillon, dans lequel aucune croissance microbienne n'a été observée, ont été étalés dans des boites de Pétri contenant de la gélose nutritive. Après 24h d'incubation, les souches bactériennes n'avaient pas poussé, dont les valeurs de CMB ont été les mêmes que celles des CMI excepté pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 où la CMB est égale à 3,12 mg/ml.

Les rapports CMB/CMI prouvent des valeurs inférieures à 4, ce qui indique que l'E.Aq de feuilles de *Fraxinus excelsior* exerce un effet bactéricide sur toutes les souches bactériennes.

#### IV.5. Discussion

Les résultats de l'activité antibactérienne d'E.Aq de *Fraxinus excelsior* (Oleaceae) à différentes concentration présente un effet inhibiteur vis-à-vis la plupart des isolats bactériens.

L'E.Aq des feuilles de *F excelsior* a produit des zones inhibitrices plus large sur les souches *Proteus mirabilis* 1 et *Staphylococcus aureus* 1, dont les diamètres de la zone d'inhibition varient entre  $12,6 \pm 0,3$  et  $14,1 \pm 0,1$  respectivement, par ailleurs, les valeurs de CMI sont relativement élevées, les plus efficaces varient entre 1,56 mg/ml pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et 3,12 mg/ml contre les souches : *Proteus mirabilis* 2, *Proteus mirabilis* 3 et *Staphylococcus albus* ATCC 8799.

Concernant la souche *Pseudomonas aeruginosa*, aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques imprégnés aux E.Aq testés, ce qui montre la résistance de cette souche. De plus, *Pseudomonas aeruginosa* possède une résistance aux agents biocides qui est en relation avec la nature de sa membrane externe (Mann et al, 2000; 2005, Bozin et al, 2006). Ce résultat corrobore plusieurs autres études (Bouabdelli et al, 2012; Tahiri et al, 2016; Mahboubi et al, 2019).

Vue qu'il n'y ait pas de données publiées sur l'activité antimicrobienne de l'E.Aq des feuilles de *F excelsior*, en particulier, le résultat de ce travail est comparable à d'autres études similaires sur des espèces du même genre ou bien des plantes de la même famille. Selon des travaux antérieures, nos résultats présentent une similitude avec des études concernant l'activité antibactérienne notamment, l'extrait de fruits de *Fraxinus excelsior* (Amamra et al, 2018), l'extrait d'huile essentielle de graines de *F excelsior* (Mahboubi, 2019), l'extrait méthanoliques de feuilles de *Olea europaea* L. (Oleaceae) (Ali et al, 2014; Himour et al, 2017), l'extrait méthanoliques de fleurs de *Nyctanthes arbor-tristis* L. (Oleaceae) (Kumar et al, 2021) et les extraits d'éthanoliques des feuilles de *Nyctanthes arbor-trisitit* (Singh et Solanki, 2022) qui ont montré un effet antibactérien relativement modéré.

De plus, Sahraoui et al. (2017; 2021) ont testé l'activité antibactérienne de l'E.Aq des feuilles de *Olea europaea* L. récoltées dans différentes régions du Maroc (Meknès, Fquih ben Salah, Taza et Ouezzane) sur la même gamme de souches bactériennes testés *Escherichia coli* ATCC

25922, les 03 souches d'*Escherichia coli*, les 03 souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* 1, *Proteus mirabilis* 2, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 1 et *Staphylococcus aureus* 2, conformément à nos résultats, ces souches y ont été sensibles avec des DI de 9 à 13 mm, 08 à 15 mm, 10 à 14 mm, 9 à 15 mm, 9 à 14 mm, 12 à 17 mm et 13 à 17 mm, respectivement. De même, les valeurs de CMI varient de 3,15 à 25 mg/ml.

Une étude menée par [Aji et al. \(2010\)](#) sur la même concentration (200 mg/ml), l'E.Aq des feuilles *Olea hochstetteri* Bak (Oleaceae) a montré des valeurs de DI 06 mm, 07 mm et 10 mm des souches *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* respectivement, ces valeurs sont nettement inférieure à celle trouvée avec notre extrait. Comme pour l'E.Aq des feuilles *Olea europaea* L, les valeurs de DI des souches *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus* étaient respectivement de 10 mm, 09 mm et 11 mm ([Bouabdelli et al, 2012](#)). Dans un autre travail, [Saynab et al. \(2020\)](#) ont rapporté que l'extrait aqueux de feuilles *Olea europaea* subsp. *africana* n'a montré aucun effet d'inhibition sur les souches *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Cette différence dans les valeurs des DI peut être expliquée par la différence de l'espèce étudiée.

La valeur de CMI de *Staphylococcus aureus* ATCC 8799 est de 3,12 mg/ml suivi par 6,25 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* 3 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ces résultats sont en accord avec les valeurs de CMI obtenus par l'extrait méthanoliques de feuilles de *Nyctanthes arbor-tristis* vis-à-vis les souches *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* ce qui correspond à une CMI comprise entre 1 et 8 mg/ml ([Amol et al, 2022](#)).

Il est important de souligner que plusieurs études suggèrent une corrélation directe entre l'activité antibactérienne et les composés phénoliques des plantes, qui a été rapportée par certains auteurs ([Himour et al, 2017](#); [Van Vuuren et al, 2009](#); [Celiktas et al, 2007](#); [Blanco et al, 2005](#); [Toda et al, 1991](#)).

L'action de l'E.Aq des feuille de *F excelsior* sur les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, d'une part, peut-être dû aux flavonoïdes qui sont des bons inhibiteurs des sortases (des transpeptidases extracellulaires) présentes dans la membrane cytoplasmique des cocci à Gram+, qui catalysent l'assemblage des protéines de surface sécrétées à la paroi cellulaire du peptidoglycane ([Thomas et al, 2011](#); [Cushnie et Lamb, 2011](#)). D'autre part, les cocci à Gram + sont être supposées les moins protégées contre les molécules antibactériennes que les bacilles à Gram -, ceci est rattaché aux différences structurales de leurs membranes

externes. Chez les cocci à Gram+, le contact direct des molécules hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité ionique et une fuite des constituants intracellulaires vitaux ou une dénaturation des systèmes enzymatiques bactériens (Ghedadba et al, 2015; Cushnie et Lamb, 2011). Tandis que les bacilles à Gram-, possèdent une couche supplémentaire riche en lipopolysaccharide forme une barrière imperméable dont les charges négatives de surface empêchent la diffusion des composés hydrophobes (Nikaido, 2003). Toutefois, des études antérieures ont démontré que les polyphénols interfèrent avec les polysaccharides qui forment le glycocalyx, perturbant leurs interactions réciproquement ou avec la paroi cellulaire en induisant sa perméabilité et la mort cellulaire. Le polyphénol est également connu pour se lier au peptidoglycane, brisant l'intégrité de la paroi cellulaire bactérienne (Yoshiyuki et al, 2004; Zhao et al, 2001; Dorman et al, 2000). Ainsi, plusieurs chercheurs ont montré que les flavonoïdes perturbent l'interaction entre les lactones acyl-homosérine (molécules signal utilisées par les bacilles à Gram-) et leurs récepteurs (Qin et al, 2000; Anderson et al, 2005).

De cet effet, le pouvoir antimicrobien de l'E.Aq des feuilles de *F. excelsior*, objet de cette étude, peut être attribuée à la présence des polyphénols et des flavonoïdes qui représentent  $60,92 \pm 0,94$  mg GAE/g et  $19,32 \pm 0,75$  mg QE/g, respectivement (Ghenaiet et al, 2022). Pareillement, Tahirović et Bašić. (2016) ont rapporté que les feuilles de *F. excelsior* sont riches en phénols et flavonoïdes. De plus, Narayana et al, (2001) ont montrés que ce dernier ayant des effets bénéfiques potentiels sur la santé telle que leurs activités antibactériennes.

En effet, Nora et al. (2012) ont indiqué que les extraits des plantes peuvent inhiber la respiration microbienne et ainsi augmenter la perméabilité de la membrane plasmique. Cela entraîne par conséquent la mort cellulaire. Par ailleurs, Al-Snafi. (2018) a mentionné que l'esculetine, la fraxine et la fraxetine étant les principaux composés responsables aux propriétés antimicrobiennes des extraits de *F. excelsior*.

Globalement, les résultats obtenus par les deux méthodes testées dans le présent travail révèlent que l'E.Aq des feuilles de *F. excelsior* exerce un effet antimicrobiens vis-à-vis les isolats testés.

#### IV.6. Conclusion

En conclusion, l'effet antibactérien présenté par l'E.Aq des feuilles de *F. excelsior* montre une source potentielle d'agents antibactériens pour lutter ou réduire le risque d'infections urinaires, qui deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques. Sur la base des résultats

obtenus, *F excelsior* exhibe un effet curatif contre l'infection urinaire et un effet préventif contre la formation des cristaux d'infection. Des travaux de corrélation in vitro et in vivo plus détaillées sont nécessaires pour confirmer l'effet de cette plante.

***Conclusion et***  
***Perspectives***

## **Conclusion générale et perspectives**

Notre principal objectif, le long de cette étude, est de contribuer à l'étude de la lithiase urinaire dans notre pays, en particulier au niveau la région « Est Algérien », par l'étude de la lithiase d'infection au niveau de cette région et la détermination de son profil épidémiologie à travers une enquête prospective. Une approche préventive, basée sur les effets antilithiasiques (litholytique/inhibiteur) et antibactériens d'une plante médicinale, a été également entreprise dans le but de proposer une alternative nouvelle dans la prise en charge de la récurrence lithiase d'origine infectieuse.

Une étude morpho-constitutionnelle réalisée sur un ensemble de 1553 calculs urinaires collectés au niveau de cette région, nous a permis de constater que la majorité des calculs sont composés d'oxalates, sels de calcium et de phosphates. Parmi ces derniers, le Phosphate Ammoniac-Magnésien (PAM ou struvite), composant caractéristique de la lithiase urinaire d'origine infectieuse. Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier, *in vitro*, la cristallisation de struvite induite par des bactéries uréolytiques prévenant des patients lithiasique.

Le choix de l'espèce lithogène dans ce travail, repose sur le fait que les calculs urinaires de struvite soient des calculs récidivants et difficiles à traiter du fait que la croissance des cristaux d'origine infectieuse se fait autours des microorganismes et leur assurent ainsi une protection et au-delà une pérennisation de leur activité uréasique. De ce fait, afin d'éviter la récurrence de struvite, une stratégie préventive efficace qui s'oppose à la cristallisation des cristaux d'origine infectieuse, s'avère nécessaire.

Au départ, les tests de formation des cristaux de struvite a été initié *in vitro* dans des urines synthétiques infectées par des bactéries uréolytiques, isolées à partir des urines des patients lithiasiques, comme c'est le cas de leur formation dans des urines réelles. On a effectué des mesures systématiquement de la D.O à 600 nm, du pH ainsi des observations au microscope a polarisation pour évaluer le dénombrement, la dimension des cristaux et agrégats cristallins obtenus pour chaque espèce bactérienne testée. La caractérisation des cristaux récupérés par analyse spectrale (FTIR), a montré que le principal composé des cristaux est le phosphate d'ammoniac-magnésien. Cette expérience, nous a permis de suivre les différentes étapes de la cristallogenèse.

Dans ces circonstances, l'intérêt de l'aspect préventif pour traiter la lithiase infectieuse et sa récurrence prend toute son ampleur et l'action, aussi bien litholytique qu'inhibitrice de croissance cristalline, de certaines plantes médicinales sur ce type de lithiase reste une éventualité

intéressante. Dans ce sens, on a choisi une plante non étudiée mais utilisée comme remède antilithiasique dans certaines régions de notre pays, *Fraxinus excelsior* (Olivées), sur laquelle on a testé les activités antilithiasique et antibactérienne. Qualitativement, le dosage des polyphénols totaux ainsi que des flavonoïdes montrent que *Fraxinus excelsior* renferme des teneurs considérables en composés phénoliques et en flavonoïdes.

Par la suite, on a évalué *in vitro* le effet litholytique de l'E.A des feuilles de *Fraxinus excelsior* vis-à-vis les cristaux de struvite préalablement formés et l'effet d'inhibition de la cristallisation de ces cristaux par deux processus différents : Dans le premier processus, la struvite a été cristallisée biologiquement dans des urines synthétiques en présence de *Proteus mirabilis*, Il s'en est suivi l'addition de l'E.Aq de *F excelsior*. Dans le second processus, les cristaux de struvite ont été synthétisés chimiquement en présence de l'E.Aq de *F excelsior*. Ces deux processus nous ont permis de constater que l'effet litholytique/inhibiteur de l'E.Aq de *F excelsior* vis-à-vis les cristaux de struvite est efficace.

Finalement, on a testé l'effet antibactérien de l'E.Aq de *Fraxinus excelsior* vis-à-vis des principales espèces responsables d'infections urinaires et, au-delà, la formation de cristaux de struvite. Cet extrait a montré un potentiel inhibiteur de croissance bactérienne modéré permettant de lutter ou réduire le risque d'infections urinaires. Il faut dire que ce risque est accru du fait que certaines bactéries sont de plus en plus résistantes aux antibiotiques. L'E.Aq de *F excelsior* montre un effet curatif contre l'infection urinaire et un effet préventif contre la formation des cristaux d'infection.

Les observations obtenues dans de telles approches expérimentales peuvent nous orienter vers un certain nombre de perspectives :

- ✓ Isoler et identifier, en postopératoire, les microorganismes présents dans les calculs
- ✓ Évaluer *in vitro*, l'effet antilithiasique de *F excelsior* sur les différents types de calculs urinaires dont la détermination des effets curatif et préventif.
- ✓ Elargir le panel des micro-organismes uérololytiques pour tester la cristallisation
- ✓ Tester la sensibilité sur des autres micro-organismes, espèces bactériennes non étudiée, des champignons et virus.
- ✓ Inhiber l'activité enzymatique uréasique.
- ✓ Isoler et déterminer les fractions les plus actives de *F excelsior* et éventuellement de caractériser les molécules responsables de l'effet antilithiasique pour connaître ainsi leurs mécanismes d'action.

## | Conclusion générale et perspectives

- ✓ L'examination d'autres facettes des propriétés biologiques de *F excelsior* pourrait être réalisée.
- ✓ Évaluer in vivo sur un modèle biologique, les effets antilithiasique et antibactérien de cette plante.

**Références**  
**Bibliographiques**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abate N., Chandalia M., Cabo-chan A.V., Moe O.W. & Sakhaee K., 2004.** The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney international*. 65(2):386-392.

**Abbona F., Boistelle R. & Haser R., 1979.** Hydrogen Bonding in  $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$  (Newberyite) *Acta Cryst.*B35: 2518.2514.

**Abdelkhalek O., 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

**Abeywickrama B., Ralapanawa U. & Chandrajith R., 2016.** Geoenvironmental factors related to high incidence of human urinary calculi (kidney stones) in Central Highlands of Sri Lanka. *Environ Geochem Health*. 38:1203–1214.

**Acharya D. & Shrivastava A., 2008.** *Indigenous Herbal Medicine: Tribal Formulations and Traditional Herbal Practices*. 1st Edition. Jaipur: Avishkar Publishers.

**Aditya Raja., Fiona W. & Hrishi B. Joshi., 2019.** The impact of urinary stone disease and their treatment on patients' quality of life: a qualitative study. *Urolithiasis*. 48: 227–234.

**Aggarwal K.P., Narula S., Kakkar M. & Tandon C., 2013.** Nephrolithiasis: Molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res Int*. 292-953. <https://doi.org/10.1155/2013/292953>

**Ahmed A.M., Nancy S.R., Aboubaker M.G. & Said K., 2014.** Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*.2, 53–56.

**Ahmed M.S., Hasan M. & Alam Z. M., 2016.** “In vitro urolithiasis models: an evaluation of prophylactic management against kidney stones,” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5 (3): 28–35.

**Ahmed S., Hasan M. & Mahamood, Z.A., 2016.** Antiurolithiatic plants: Formulations used in different countries and cultures. *Pak J Pharm Sci*. 29(6):2129–2139.

**Aji S.B., Auwal M.S., Onyeyili P.A. & Dawurung C.J., 2010.** Phytochemical Screening and Antibacterial Evaluation of the Leaves Extracts of *Olea hochstetteri* Bak. (Oleaceae). *Research Journal of Pharmacology*. 4 (2): 26 – 30.

**Akagashi K., Tanda H., Kato S., Ohnishi S., Nakajima H., Nanbu A., Nitta T., Koroku M., Sato Y. & Hanzawa T., 2004.** Characteristics of patients with staghorn calculi in our experience. *Int J Urol*. 11:276-81. Doi: 10.1111/j.1442-2042.2004.00800.x

**Alapont Pérez F.M., Gálvez Calderón J., Varea Herrero J., Colome Borros G., Olaso Oltra A. & Sánchez Bisoño J.R., 2001.** Epidemiología de la litiasis urinaria. *Actas Urol Esp*. 25 (5): 341-349.

**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. *Progrès en urologie* 22: 938-944.

**Alblowi S., Safdar O., Aboulola N., Alharazy D. & Najem N., 2022.** Renal stone prevalence and risk factors in Jeddah and Riyadh. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 11(6): 2839-2845. DOI: 10.4103/jfmprc.jfmprc\_511\_21

**Ali M.H., Falah H.S. & Ausama A.J., 2014.** Urinary Tract Infection Prevalence and Antibiotic Resistance A Retrospective Study in Basra Governorate, Iraq. *AJPS*. 14(2): 8pp.

**Al-Jebouri M.M. & Atalah N., 2012.** A Study on the Interrelationship between Renal Calculi, Hormonal Abnormalities and Urinary Tract Infections in Iraqi Patients *Open Journal of Urology*. 2: 6-10. <http://dx.doi.org/10.4236/oju.2012.21002>

**Allegrini J., Bouchberg M.S. & Maillols H., 1973.** Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. *Société de Pharmacie de Montpellier*. 33: 73-86.

**Al-Snafi A.E., 2018.** Chemical constituents and pharmacological effects of *Fraxinus ornus*- a review. *Indo Am. J. P. Sci*, 2018; 05(03): 1721-1727. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1210511>

**Amamra S., Charef N., Arrar L., Belhaddad O., Khennouf S., Zaim K. & Baghiani A., 2018.** Phenolic Content, Antioxidant and Antibacterial Effects of Fruit Extracts of Algerian Ash, *Fraxinus excelsior*. *Indian J Pharm Sci*. 80(6):1021-1028.

**Amato M., Lusini ML. & Nelli F., 2004.** Epidemiology of nephrolithiasis today. *Urol Int*; 72(Suppl 1):1-5.

**Amol K.D., Ravindra S.J. & Dattaprasad N.V., 2022.** Review on *Nyctanthes arbor-tristis* leaves: a potential medicinal herb. *wjpmr*, 8(4):128 – 132.

**Amritan K., Monika B. & Mamta B., 2016.** In vitro evaluation of anti-nephrolithiatic activity of leaves and seeds of *Macrotyloma uniflorum* on dissolution or removal of kidney stones. *Res. J. Pharmacognosy & Phytochem*. 8(1): 05-12. doi: 10.5958/0975-4385.2016.00002.9

**Anand D, John W.W., Saravanan P. & Rajarajan S., 2014.** Phytochemical analysis of leaf extract of *Eclipta alba* (L.) Hassk by GC-MS method. *Int J Pharmacogn Phytochemical Res*. 6 (3):562e566.

**Anderson J.C., Headley C., Stapleton P.D. & Taylor P.W., 2005.** Synthesis and antibacterial activity of hydrolytically stable (-)-epicatechin gallate analogues for the modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem Lett*. 15:2633-5.

- Arkusz K., Pasik K., Halinski A. & Halinski A., 2021.** Surface analysis of ureteral stent before and after implantation in the bodies of child patients. *Urolithiasis*. 49: 83–92.
- Asadbeigi M., Mohammadi T., Rafieian-Kopaei M., Saki K., Bahmani M. & Delfan B., 2014.** Traditional effects of medicinal plants in the treatment of respiratory diseases and disorders: an ethnobotanical study in the Urmia. *Asian Pac J Trop Med*. 7: S364-8. doi: 10.1016/s1995-7645(14)60259-5.
- Ashraf M.S., Gaur S., Bushen O.Y., Chopra T. & Chung P., 2020.** Diagnosis, Treatment, and Prevention of Urinary Tract Infections in Post-Acute and Long Term Care Settings: A Consensus Statement from AMDA’s Infection Advisory Subcommittee. *JAMDA*. 21: 12e24.
- Atmani S., Aouragh R., Bouharrou A. & Hida M., 2007.** L’infection des voies urinaires du nouveau-né: à propos de 23 cas. *Journal de pédiatrie et de puériculture*. 20: 70–73.
- Aulus C.C., 1883.** “Book VII, Chapter XXVI: Of the operation necessary in a suppression of urine, and lithotomy”. In Collier GF: A translation of the eight books of Aul. Corn. Celsus on medicine, 2nd ed., London: Simpkin and Marshall. pp. 306-314
- Baheti D.G. & Kadam S.S., 2013.** Antiuro lithiatic activity of some traditional medicinal plants against calcium oxalate induced urolithiasis in rats. *IJPCBS*. 3(4): 1276-1285.
- Bahmani M, Babak B.A., Pegah Ti, Rafieian-Kopaei M. & Naghdi N., 2016.** Identification of medicinal plants for the treatment of kidney and urinary stones. *J Renal Inj Prev*. 5(3): 129-133. DOI: 10.15171/jrip.2016.27.
- Bai N, He K, Roller M., Lai C.S., Shao X. & Pan M.H., 2013.** Secoiridoidglucosides from *Fraxinus excelsior* with effects on LPS-induced nitrite production in RAW 264.7 macrophages and human cancer cell lines. In: Juliani HR, Simon JE, Ho CT, editors. *African natural plant products: Discoveries and Challenges in Chemistry, Health, and Nutrition*. Vol. 2. Washington, DC: ACS Symposium Series, American Chemical Society. p.115.
- Balédent F., 2019.** Les cristaux urinaires. Développement & santé; 2019 <https://devsante.org/articles/les-cristaux-urinaires>
- Bangaru S. & Veeram J.R., 2014.** Review on anti-urolithiatic activity of medicinal plants. *Compr Phar*. 1(3):51-68.
- Banks E., Chianelli R. & Korenstein, R., 1975.** Crystal chemistry of struvite analogs of the type  $MgMPO_4 \cdot 6H_2O$  ( $M^+ = K^+, Rb^+, Cs^+, Ti^+, NH_4^+$ ). *Inorg. Chem*. 14, 1634–1639.
- Basavaraj D.R., Biyani C.S., Browning A.J. & Cartledge J. J., 2007.** “The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones,” *EAU EBU Update Series*. 5 (3): 126–136.
- Bazin D.M., Daudon P., Chevallier S., Rouziere E. & Elkaim D., 2006.** Thiaudiere Les techniques de rayonnement synchrotron au service de la caractérisation d’objets biologiques : un exemple d’application, les calculs rénaux. *Ann Biol Clin*. 64 (2) : 125-39.
- Beghalia M., Belouatek A., Ghalem S. & Allali H., 2014.** Inhibition and Dissolution Crystals of Magnesium Ammonium Phosphate by *Acacia Radiana* (Bark) and (Sheet) in Vitro Study

Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg. 1: 1523-1531.  
<http://dx.doi.org/10.15242/IJAAEE.C514072>

**Ben Omar N., Gonzalez-Munoz M.T. & Penalver J.M.A., 2014.** Struvite crystallization on Myxococcus cells. Chemosphere. 36: 475–48.

**Beveridge J.T., 1989.** Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. Annual Review of Microbiology. 43: 147-171.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189.001051>

**Bhadra B., Roy, P. & Chakraborty, R., 2005.** *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. Int. J. Syst. Evol. Microbio. 55: 2155–2158.

**Bichler K.H, Eipper E. & Naber K., 2003.** Infection-induced urinary stones. Urologe A. 42:47-55. DOI: 10.1007/s00120-002-0272-5.

**Bichler K. H., Eipper E., Naber K., Braun V., Zimmermann R. & Lahme S., 2002.** Urinary infection stones. Int. J. Antimicrob. Agents 19, 488–498.

**Bindhu B., Swetha A.S & Veluraja K., 2015.** Studies on the effect of Phyllanthus emblica extract on the growth of urinary type struvite crystals in-vitro. Clin Phytoscience. 1(3):1e7

**Biocic M., Saraga M., Cvitkovic K.A, Bahtijarevic Z., Budimir D., Todoric J. & Majhen U.R (2003).** Pediatric urolithiasis in Croatia. Coll Antropol. 27(2):745–752.

**Blanco A.R., Sudano-Roccaro A., Spoto G.C., Nostro A., & Rusciano D., 2005.** Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular Staphylococcal Isolates. ASM Journals; Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(10): 4339-4343.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4339-4343.2005>

**Boistelle R., Abbona F., 1981.** Morphology, habit and growth of newbérîte crystals ( $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$ ). J Crystal Growth. 54:275-295

**Bouabdelli F., Djelloul A., Kaid-Omar Z., Semmoud A. & Addou A., 2012.** Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria Asian Pacific Journal of Tropical Disease. S530-S535.

**Boutabia L., Telailia S., Bouguetof I., Guenadil F. & Chefrou A., 2016.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis. L. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 85: 174 – 189.

**Bouatia M., Benramdane L., Oulad Bouyahya Idrissi M. & Draoui M., 2015.** An epidemiological study on the composition of urinary stones in Morocco in relation to age and sex. African Journal of Urology. 21, 194–197.

**Boumzaoued H., Laziri F., El Lekhlifi Z., Qarro A. & El Assyry A., 2015.** Prévalence hospitalière de la lithiase urinaire à l'hôpital militaire Moulay Ismail (Meknès-Maroc). J. Mater. Environ. Sci. 6 (6): 1578-1583.

**Bouzidi H., Traxer O., Doré B., Amiel J., Hadjadj H., Conort P. & Daudon M., 2008.** Caractéristiques des incrustations des endoprothèses urétérales chez les patients lithiasiques. Progrès en urologie. 18 : 230-237. Doi : 10.1016/j.purol.2008.02.004

- Brikowski T.H., Lotan Y. & Pearle M.S., 2008.** Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105:9841–9846.
- Brown T.R., 1901.** On the relation between the variety of microorganisms and the composition of stone in calculous pyelonephritis. *J. Am. Med. Assoc.* 36: 1395–1397.
- Bultitude M. & Rees J., 2012.** Management of renal colic. *BMJ.* 345:e5499. <https://doi.org/10.1136/bmj.e5499>
- Bruyerea F., Traxer O., Saussinec C. & Lechevallier E., 2008.** Infection et lithiase urinaire. *Progrès en urologie*.18 : 1015-1020. Doi : 10.1016/j.purol.2008.09.015.
- Cai Y., Strømme M. & Welch K., 2014.** Bacteria viability assessment after photocatalytic treatment. *3 Biotech.* 4:149–157.
- Cakiroglu B., Eyyupoglu E., I. Hazar A., Uyanik B. S. & Nuhoglu B., 2016.** Metabolic assessment of recurrent and first renal calcium oxalate stone formers. *Archivio Italiano diUrologia e Andrologia.* 88: 101–105.
- Carpentier X., Daudon M., Traxer O., Jungers P. & Mazouyes A., 2009.** Relationships between carbonation rate of carbapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology. *Urology.* 73: 968–975. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2008.12.049>
- Castiglione V., Jouret F., Bruyère O., Dubois B., Thomas A., Waltregny D., Bekaert A.C., Cavalier É. & Gadisseur R., 2015.** Épidémiologie de la lithiase urinaire en Belgique sur base d'une classification morphoconstitutionnelle. *Néphrologie & Thérapeutique.* 11:42–49.
- Celiktas O.Y., Kocabas E.E.H., Bedir E., Sukan F.V., Ozek T. & Baser K.H.C., 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry.*100: 553 559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.011>
- Centeno V., Barboza G. D. & Marchionatti A., 2009.** Molecular mechanisms triggered by low-calcium diets. *Nutrition Research Reviews*; 22 (2):163–174
- Chamy C.M. & Rouprêt M., 2014.** Lithiase urinaire: prise en charge en urologie. *EMC.* 9(3): 5-069. [http://dx.doi.org/10.1016/S1634-6939\(14\)6547-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1634-6939(14)6547-0)
- Chandaka M., Harish L., Reddy K.N., Sagar S., Soumya D. & Kumar P.G., 2012.** Antiurolithic Activity of Aqueous Extract on Roots and Seeds of *Plectranthus tomentosa* on Ethylene Glycol Induced kidney Stones in Male Albino Rats. *Asian J. Res. Pharm. Sci.* 2(4): Oct.-Dec. Page 129-133.
- Chandrajith R., Wijewardana G., Dissanayake C.B. & Abeygunasekara A., 2006.** Biomineralogy of human urinary calculi (kidney stones) from some geographic regions of Sri Lanka. *Environmental Geochemistry and Health.* 28, 393–399.
- Charles D., Alexandria C., Janet M. & Christopher S., 2012.** Prevalence of Kidney Stones in the United States. *European Urology.*62, 160–165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2012.03.052>
- Chauhan C.K. & Joshi M.J., 2013.** In vitro crystallization, characterization and growth inhibition study of urinary type struvite crystals. *Journal of Crystal Growth.* 362: 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2011.11.008>

**Chauhan C.K., Joshi M.J. & Vaidya A.D.B., 2009.** Growth Inhibition of Struvite Crystals in the Presence of Herbal Extract *Boerhavia diffusa* Linn. American Journal of Infectious Diseases. 5 (3): 170–179. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2009.170.179>

**Chauhan C.K., Joshi M.J. & Vaidya A.D.B., 2009.** Growth inhibition of Struvite crystals in the presence of herbal extract *Commiphora wightii*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 20(1): 85. <https://doi.org/10.1007/>

**Chouaki S., 2006.** Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques. INRAAFAO, 92p.

**Chauhan C.K., Josh M.J., 2013.** In vitro crystallization, characterization and growth-inhibition study of urinary type struvite crystals. Journal of Crystal Growth. 362: 330–337 doi:10.1016/j.jcrysgro.2011.11.008.

**Chew B.H., 2006.** New developments in ureteral stent design, materials and coatings. Expert Rev Med Devices. 3: 395-403. DOI: 10.1586/17434440.3.3.395.

**Chou Y.H., Huang C.N., Li W.M., Huang S.P., Wu W.J., Tsai C.C., Chang A.W., Chen S.M., Lin Y.L. & Lin Y.P., 2012.** Clinical study of ammonium acid urate urolithiasis. Kaohsiung J. Med. Sci. 28: 259–264.

**Coe F.L., Evan A. & Worcester E., 2005.** Kidney stone disease. J Clin Invest. 115: 2598-608.

**Coker C., Poore C.A., Li X. & Mobley H.L.T., 2000.** Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. Microbes Infect. 2: 1497–1505

**Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CASFM), 2012.** Recommandations 2012, Paris, France.

**Courbebaisse M., Prot-Bertoye, C., Bertocchio J.P., Baron S., Maruani G., Briand S. & Curhan G.C., 2007.** Epidemiology of Stone Disease. Urol Clin North Am. 34:287-93.

**Cushnie T. & Lamb A.J. 2011.** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. International Journal of Antimicrobial. 38: 99– 107. [doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014)

**Das P., Gupta G., Velu V., Awasthi R., Dua K. & Malipeddi H., 2017.** Formation of struvite urinary stones and approaches towards the Inhibition-A review Biomedicine & Pharmacotherapy. 96: 361–370.

**Daudon M., 1987.** Cristallurie. Aspects pratiques et interprétations I. Aspects pratiques Feuilles de biologie. 28: 25-40

**Daudon M., 1989.** Mécanisme de la lithogénèse. In: Jungers P, Daudon M, Le Duc A, editors. Lithiase Urinaire. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. pp. 114-57

- Daudon M. & Houillier P., 2016.** Lithiase rénale de l'adulte: des mécanismes au traitement médical préventif. *La Revue de médecine interne.* 38: 44–52.
- Daudon M., 2000.** Component analysis of urinary calculi in the etiologic diagnosis of urolithiasis in the child. *Arch Pediatr.* 7: 855– 65.
- Daudon M., 2005.** Épidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. *Annales d'urologie* 39: 209–231.
- Daudon M., 2013.** La cristallurie. *EMC Néphrologie-Urologie.* 10 (4) :18-026-C- 50
- Daudon M., 2013.** La cristallurie : un marqueur diagnostique et pronostique des pathologies cristallogènes et des lithiases rénales. *Revue francophone des laboratoires.* 455: 67-73.
- Daudon M., 2013.** Lithogénèse. *EMC-Urologie.* 6(4): 1-13. Doi : 10.1016/S1762-0953(13)46401-4
- Daudon M., 2015.** Cristallurie. *Néphrologie & Thérapeutique.* 11(3): 174-190. [http://dx.doi.org/10.1016/S1762-0953\(13\)46401-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1762-0953(13)46401-4)
- Daudon M., Bader C.A. & Jungers P., 1993.** Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc;* 7:1081–1104.
- Daudon M., Cohen-Solal F., Lacour B. & Jungers P., 2003.** [Urinary stones and urinary tract abnormalities. Is the stone composition independent of the anatomical abnormality?]. *Progrès en Urologie.*13 (6): 1320-1329.
- Daudon M., Dessombz A., Frochot V., Letavernier E., Haymann J.P & Jungers P., 2016.** Comprehensive morpho-constitutional analysis of urinary stones improves etiological diagnosis and therapeutic strategy of nephrolithiasis. *CR Chim;* 19(11): 1470-91.
- Daudon M. & Frochot V., 2015.** Crystalluria. *De Gruyter-Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 53(Suppl), 1479–1487. DOI 10.1515/cclm-2015-0860
- Daudon M., Frochot V., Bazin D. & Jungers P., 2018.** Drug-induced kidney stones and crystalline nephropathy: Pathophysiology, prevention and treatment. *Drugs.* 78:163–201. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0853-7>
- Daudon M. & Jungers B.P, 2004.** Lacour. Intérêt clinique de l'étude de la cristallurie. *Ann Biol Clin* 62 : 379-93 la forme X (forme croix) des cristaux de struvite
- Daudon M., Jungers P. & Lacour B., 2004.** Intérêt clinique de l'étude de la cristallurie. *Ann Biol Clin.* 62: 379-93.
- Daudon M., Panteix G., Sagnol I. & Petit I., 2007.** Caractéristiques épidémiologiques régionales de la lithiase urinaire en France. *Feuilles de biologie.* XXXXVII(277) :45-51.
- Daudon M., Protat M.F. & Réveillaud R.J., 1978.** Analyse des calculs par spectrophotométrie infrarouge Avantages et limites de la méthode. *Ann Biol Clin.* 36:475–489.
- Daudon M., Traxer O. & Jungers P., 2012.** Lithiase Urinaire. 2ème ed. Médecine Sciences. Lavoisier, Paris, 672 pages.
- Daudon M., Traxer O., Lechevallier E. & Saussine C., 2008.** Epidémiologie des lithiases urinaires. *Prog Urol;* 18:802–814.doi:10.1016/j.purol.2008.09.029

**Dawson C.H. & Tomson C.R., 2012.** Kidney stone disease: Pathophysiology, investigation and medical treatment. Clin Med (Lond). 12: 467-471.

**Dayal B. & Purohit R.M., 1971.** Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. flavour ind. 2: 484-485.

**Deguchi T., Yoshida T., Miyazawa T., Yasuda M., Tamaki M. & Ishiko H., 2001.** Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with non gonococcal urethritis. Sex Transm Dis. 31: 199-8.

**Delatte L.C. & Santos M., 1977.** Calcified Bacteria in Renal Stones: Electron-Microscopic Aspects. Eur. Urol. 3, 96. <https://doi.org/10.1159/000472067>

**Diangienda P., Kuntima D., Moningo D.M., Makulo J.R.R., Sumaili E.K., Mafuta E.M. & Mayindu A.N., 2021.** Morpho-constitutional analysis of urinary stones from patients with urolithiasis in the Democratic Republic of Congo. African Journal of Urology. 27 (99):

**Dictionary of Natural Products, 2001.** Version 9:2, Chapman & Hall/ CRC, Florida.

**Djabou N., Lorenzi V., Guinoiseau E., Andreani S., Giuliani M.C., Desjobert J.M., Bolla J.M., Costa J., Berti L., Luciani A. & Muselli A., 2013.** Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. Food Control. 30: 354-363.

**Djelloul Z., Djelloul A., Bedjaoui A., Kaid-Omar Z., Attar A., Daudon M. & Addou A., 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. Progrès en Urologie. 16, 328-335.

**Dorman H.J.D. & Deans S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88(3): 308-316.

**Doyle J. D., Oldring K. & Churchley J., 2012.** Struvite formation and the fouling propensity of different materials. Water Res. 36: 3971–3978.

**Dradamanis M., 2013.** Pathomechanisms of nephrolithiasis. Hippokratia. 100-7.

**Dretler S.P. & Pfister RC, 1984.** Primary dissolution therapy of struvite calculi. The Journal of urology. 131(5):861-3. doi: 10.1016/s0022-5347(17)50683-7.

**Durgawale P., Shariff A., Hendre A., Patil S. & Sontakke A., 2010.** Chemical analysis of stones and its significance in urolithiasis. Biomedical Research. 21: 305-210.

**Eddouks M. & Maghrani M., 2004.** Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats. J Ethnopharmacol. 94 (1):149–154.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.005>

**Eddouks M., Maghrani M., Zeggwagh N.A., Haloui M. & Michel J.B., 2005.** *Fraxinus excelsior* L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously hypertensive rats. J Ethnopharmacol. 99 (1): 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.050>

**Eisner B.H. & Goldfarb D.S., 2014.** A nomogram for the prediction of kidney stone recurrence. *J Am Soc Nephrol.* 25:2685–2687.

**Ekane S, Wildschutz T, Simon J. & Schulman CC., 1997.** Lithiase urinaire: épidémiologie et physiopathologie. *Acta Urol Belg.* 65:1–8.

**El-Ghazaly M., Khayyal M.T., Okpanyi S.N. & Arens-Corell M., 1992.** Study of the anti-inflammatory activity of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior*. *Arznei mittel-Forschung.* 42: 333–336.

**El Habbani R., Lahrichi A., Houssaini T. S., Kachkoul R., Mohim M., Chouhani B. A. & A. Chaqroune., 2021.** In vitro mass reduction of calcium oxalate urinary calculi by some medicinal plants. *African Journal of Urology.* 27:28: 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12301-021-00132-2>

**El Kalamouni C., 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, Toulouse, France.

**Elliot J.S., Quaide W.L., Sharp R.F. & Lewis U., 1958.** Mineralogic studies of urine: the relationship of apatite, brushite and struvite to urinary pH. *J. Urol.* 80: 269–271.

**Elliot J.S., Sharp R.F. & Lewis L., 1959.** The solubility of struvite in urine. *J. Urol.* 81: 366–368

**Englert K.M., McAteer J A., Lingeman J.E. & Williams J.C., 2013.** Jr. High carbonate level of apatite in kidney stones implies infection, but is it predictive? *Urolithiasis.* 41: 389–394.

**Esen Tarık. & Oktar Tayfun., 2010.** Urinary Tract Stone Disease Chapter Medical Management of Struvite Stones. 1497:681–686

**Falleh H., Ksoui R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. & Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt Rend Biol.* 331(5): 372-379. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.02.008>

**Ferraro P.M. & Bargagli M., 2021.** Dietetic and lifestyle recommendations for stone formers. *Arch Esp Urol.* 74:112-22.

**Ferraro P.M., Bargagli M., Trinchieri A. & Gambaro G., 2020.** Risk of kidney stones: Influence of dietary factors, dietary patterns, and vegetarian–vegan diets. *Nutrients.* 12:779.

**Flanagan J., Meyer M., Angeles P.M., Ibarra A., Roller M. & Genoher N.A., 2013.** Safety evaluation and nutritional composition of a *Fraxinus excelsior* seed extract, FraxiPure™. *Food and Chemical Toxicology.* 53: 10–17. Doi: 10.1016/j.fct.2012.11.030. [PubMed: 23201448].

**Flanagan J., Meyer M., Pasamar M.A., Ibarra A., Roller M., Genoher N.A.i, Leiva S., Gomez-García F., Alcaraz M. & Martínez-Carrasco A., 2013.** Vicente V. Safety evaluation and nutritional composition of a *Fraxinus excelsior* seed extract, FraxiPure™. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 53:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.030>

**Flannigan R., Choy W.H., Chew B. & Lange D., 2014.** Renal struvite stones-pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nat Rev Urol.* 11(6):333–341. <https://doi.org/10.1038/>

**Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon Mi. & Hultgren S.J., 2015.** Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 13(5): 269–284.

**Follmer C., 2010.** Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J Clin Pathol.* 63:424-430. doi:10.1136/jcp.2009.072595

**Foxman B., 2014.** Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am.* 28:1–13.

**Fowler J. 1985.** *Staphylococcus saprophyticus* as the cause of infected urinary calculus. *Ann Intern Med;* 102: 342-3.

**Fowler J. E., 1984.** Bacteriology of branched renal calculi and accompanying urinary tract infection. *J. Urol.* 131:213–215.

**Garg N.K, Mangal S., Sahu T., Mehta A., Vyas S.P. & Tyagi R.K., 2011.** Evaluation of anti-apoptotic activity of different dietary antioxidants in renal cell carcinoma against hydrogen peroxide. *Asian Pac J Trop Biomed.* 57-63.

**García-Perdomo H.A., Solarte P.B. & Posada E.P., 2016.** Pathophysiology associated with forming urinary stones. *Urol Colomb.* 25 (2): 118-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.uroco.2015.12.012>

**Gavin C.T., Ali S.N., Taily Tolvera-Posada., D., Alenezi H., Power N.E., Hou J., Amant A.H.S., Luyt L.G., Wood S., Wu C., Razvi H. & Leong H.S., 2016.** Novel methods of determining urinary calculi composition: petrographic thin sectioning of calculi and nanoscale flow cytometry urinalysis. *Sci. Rep.* 6:1–12.

**Geetha K., Manavalan R. & Venkappaya D., 2010.** Effects and Causes of Lithiasis. *Research J. Pharmacology and Pharmacodynamics.* 2(4): 261-267.

**Ghedadba N.L., Aberkane H.A., Bousselfela H. & Oueld-Mokhtar S.M., 2015.** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie.* 13:118-129. [DOI 10.1007/s10298-015-0944-4](https://doi.org/10.1007/s10298-015-0944-4)

**Ghenaiet K., Boutefnouchet A., Lekouaghet A., Boutefnouchet N. & Tichati L., 2022.** Evaluation of the Antilithiasic activity, Phospho-ammoniac-magnésien of the aqueous extract of *Fraxinus Excelsior* (L.) *Asian J. Research Chem.* 15(6): 459- 465.

**Grases F., Costa-Bauzá A., Prieto R.M., Miguel A., Tomás D.H. & Lancina J.A., 2011.** Urinary lithogenesis risk tests: Comparison of a commercial kit and a laboratory prototype test. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology.* 45: 312–318.

DOI: 10.3109/00365599.2011.584551

**Grases F., Sahnel O., Costa-Bauza A., Ramis M. & Wang Z., 2001.** Study on concretions developed around urinary catheters and mechanisms of renal calculi development. *Nephron*. 88: 320-8.

**Griffith D.P., 1978** Struvite stones. *Kidney Int.* 13, 372–382.

**Griffith D.P., 1979.** Urease stones. *Urol Res.* 7:215-21.

**Griffith D.P., Gleeson M.J., Lee H, Longuet R, Deman E. & Earle N., 1991.** Randomized, double-blind trial of Lithostat (acetohydroxamic acid) in the palliative treatment of infection-induced urinary calculi. *European urology.* 20(3):243-7. doi: 10.1159/000471707.

**Griffith D.P., Musher D.M. & Itin C., 1976.** Urease: the primary cause of infection-induced urinary stones, *Invest. Urol.* 13: 346–350.

**Gulluce M., Şahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. & Ozkan H., 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chem.* 103: 1449–1456

**Gundermann K-J. & Müller J., 2007.** Phytodolor--effects and efficacy of a herbal medicine; *Wien Med Wochenschr.* 157 (13-14): 343-7. doi: 10.1007/s10354-007-0436-4.

**Gupta A. & Chaphalkar S.R., 2016.** Anti-inflammatory and immunosuppressive activities of some flavonoids from medicinal plants. *J HerbMed Pharmacol.* 5: 120-4.

**Halinski A., Bhatti K.H., Boeri L., Cloutier J., Davidoff K. & Elqady A., 2023.** Spectrum of Bacterial Pathogens from Urinary Infections Associated with Struvite and Metabolic Stones. *Diagnostics.* 13: 80. <https://doi.org/10.3390/>

**Haq J.A., Khan M.A. & Afroze N.H., 2007.** Localized primary renal aspergillosis in a diabetic patient following lithotripsy - a case report. *BMC Infect Dis.*7:58—9.

**Hannan T.J, Totsika M., Mansfield J.K., Moore K.H., Schembri M.A. & Hultgren S.J., 2012.** Host–pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev.* 36: 616–648.

**Han, Z., Sun B., Zhao H., Yan H Han M & Zhao Y., 2016.** Isolation of *Leclercia adcarboxglata* strain JLS1 from dolostone sample and characterization of its induced struvite minerals. *Geomicrobiol. J.* 34, 500–510.

**Han Z., Zhao Y., Yan H., Zhao H., Han M. & Sun B., 2015.** Struvite precipitation induced by a novel sulfate-reducing bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* SRB4 isolated from river sediment. *Geomicrobiol. J.* 32, 868–877.

**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. *L’Eurobiologiste.* 31: 69-74.

**Healy K.A. & Ogan K., 2007.** Pathophysiology and management of infectious staghorn calculi. *Urol Clin North Am.* 34: 363-74.

**Hedelin H., 2002.** Uropathogens and urinary tract concretion formation and catheter encrustations. *Int J Antimicrob Agents.* 19: 484-7.

**Hedelin H., Edine-Liljegren A., Grenabo L., Hugosson J., Larsson P. & Petterson S., 1993** Crystal adherence to rat bladder epithelium after long-term E.coli infection. Scand J Urol Nephrol 1993; 27(1): 71-74.

**Hess B., Jordi S., Zipperle L., Ettinger E. & Giovanoli R., 2000.** Citrate determines calcium oxalate crystallization kinetics and crystal morphology-studies in the presence of Tamm-Horsfall protein of a healthy subject and a severely recurrent calcium stone former. Nephrol Dial Transplant. 15:366–374.

**Himour S., Yahia A. & Belattar H., 2017.** Oleuropein and Antibacterial Activities of *Olea europaea* L. Leaf Extract. European Scientific Journal. 3(6): 1857 – 7881.

**Hobbs T., Schultz L.N., Lauchnor E.G., Gerlach R. & Lange D., 2018.** Evaluation of biofilm induced urinary infection stone formation in a novel laboratory model system. J. Urol. 199, 178–185.1.

**Hooton T.M., 2012.** Uncomplicated urinary tract infection. New Engl J Med. 366: 1028–1037.

**Hövelmann Jörn, Stawski T.M. , Freeman H.M., Besselink R., Mayanna S., H. Perez J.P., Hondow N.S. & Benning L.G., 2019.** Struvite Crystallisation and the Effect of Co<sup>2+</sup> Ions. Minerals. 9, 503. Doi: 10.3390/min9090503

**Ibarra A., Bai N., He K., Bily A., Cases J. & Roller M., 2011.** *Fraxinus excelsior* seed extract FraxiPure limits weight gains and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice. Phytomedicine. 18 (6):479–85. doi: 10.1016/j.phymed.2010.09.010. [PubMed: 21036576].

**Igoli J.O., Igwue I.C. & Ioli N.P., 2003.** Traditional medicinal practices amongst the Igede people of Nigeria. J Herb, Species Med Plants. 10 (4):1e10.

**Jeyaleela D.G., Vimala R.J., Senthil R., Anandagopu P. & Manjula K., 2019.** Isolation, Characterization, Molecular Docking and in vitro Studies of Inhibitory Effect on the Growth of Struvite Crystal Derived from *Melia dubia* Leaf Extract. Asian Journal of Chemistry. 31(11): 2628-2634. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22217>

**Joshi H.N., Singh A.K. & Karmacharya R.M., 2020.** Types of Renal Stones and its Variation with Age and Gender in a University Hospital of Nepal. Kathmandu University Medical Journal. 18(2):90-93. DOI:10.3126/kumj.v18i2.33266

**Joshi P.C., Patil S.A. & Sambrekar S.N., 2012.** Evaluation of the Antiurolithiatic activity of ethonolic extctrat of celosia argentea (seeds) in rates. UJP. 01(01):52-60.

**Joubert T.L., Chambon P. & Gattefosse M., 1958.** Détermination du pouvoir bactériostatique et bactéricide des essences pures et mélanges. Bull. Tech. Gatte. 5: 7-16.

**Jungers P., Daudon M. & Le Duc A., 1989.** Lithiase urinaire. Flammarion Médecine-Sciences. 590 p.

**Jyothi M.J., Prathyusha S., Mohanalakshmi S., Praveen Kumar V.S. & Ashok Kumar C.K., 2012.** Potent herbal wealth with litholytic activity: a review. International Journal of Innovative Drug Discovery. 2 (2): 66-75.

**Kalai R. & Sasirekha B., 2018.** Dietary Guidelines to Reduce the Risk of Renal Stones. *Int. J. Nur. Edu. and Research.* 6(1): 73-77. doi: 10.5958/2454-2660.2018.00018.2

**Kaleeswaran B., Ramadevi S., Murugesan R., Srigopalram S., Suman T. & Balasubramanian T., 2019.** Evaluation of anti-urolithiatic potential of ethyl acetate extract of *Pedalium murex* L. on struvite crystal (kidney stone). *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 9 (1):24–37. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.003>

**Kambou T., Traore A.C., Zango B., Bonkougou B., Ouattara T. & Sanou A., 2005.** La lithiase de haut appareil urinaire au centre hospitalier universitaire sanou souro de Bobodioulasso (Burkina Faso) : Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques : à propos de 110 cas. *African Journal of Urology.* 11 (1): 55-60.

**Kappaun K., Piovesan A.R., Carlini C.R. & Ligabue-Braun R., 2018.** Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties. *Journal of Advanced Research.* 13:3–17. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>

**Katica M., Ahmed N.H., Gradašćević N., Salkić A. & Dervišević E., 2020.** A contribution to the study of crystalluria: significance in the diagnosis of metabolic and renal diseases. *J AdvVetBioSci Tech.* 5(2): 81-89.

**Kavanagh P.J., 1979.** *People and Weather.* Calder Publications Ltd, United Kingdom. 170 Pages.

**Kazumi Taguchi., Sung Yong Cho., Anthony C.F.N., Manint Usawachintachit., Yung-Khan T, Yao Liang Deng. & Cheng-Huang Shen., 2019.** The Urological Association of Asia clinical guideline for urinary stone disease. *International Journal of Urology.* 26:688-709. doi: 10.1111/iju.13957

**Kelly A., Healy M.D. & Kenneth Ogan M.D., 2007.** Pathophysiology and Management of Infectious Staghorn Calculi. *Urol Clin N Am.* 34: 363–374. doi:10.1016/j.ucl.2007.05.006

**Kenner D. & Requena Y., 1996.** *Botanical Medicine: A European Professional Perspective.* Paradigm Publications, USA. 89-183.

**Khan S.R. & Kok D.J., 2004.** Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci.* 9:1450–1482.

**Khitri W., Lachgueur N., Tasfaout A., Lardjam A. & Khalfa A., 2016.** Plantes antilithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d’Oran, Algérie : Approche ethnobotanique et phytochimique. *Revue d’ethnoécologie.* 9: 2267–2419.

<https://doi.org/10.4000/ethnoecologie.2511>

**Khokhlenkova N.V., Buryak M.V., Povrozina O.V. & Kamina T.V., 2019.** Principles of the Urolithiasis Phytotherapy. *Research J. Pharm. and Tech.* 12(9): 4559-4564. doi: 10.5958/0974-360X.2019.00784.4

**Kittanamongkolchai W., Vaughan Lisa.E., Enders Felicity.T., Vrtiska Terri J., Lieske John C. & Rule Andrew D., 2018.** The changing incidence and presentation of urinary stones over 3 decades. *Mayo Clin Proc.* 93(3):291–299.

- Knoll T., Schubert AB., Fahlenkamp D., Leusmann D.B., Wendt-Nordahl G. & Schubert G., 2011.** Urolithiasis through the ages: data on more than 200,000 urinary stone analyses. *J Urol*; 185 (4):1304–11.
- Kostova I. & Iossifova T., 2007.** Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*. 78: 85–106. doi: 10.1016/j.fitote.2006.08.002. [PubMed: 17184933].
- Kramer G., Klingler H.C. & Steiner G.E., 2000.** “Role of bacteria in the development of kidney stones,” *Current Opinion in Urology*. 10 (1): 35–38.
- Kumar K.D., Pushpa V.R, Parimalam M., Palukuri P., Kumar Y. & Venkadesh B., 2021.** Preliminary pharmacological studies on *Nyctanthes arbor-tristis* l. flower extract. *Annals of R.S.C.B.* 25 (6): 1759-17690
- Kukreja R., Desai M., Patel S.H. & Desai MR., 2003.** Nephrolithiasis associated with renal insufficiency: factors predicting outcome. *J Endourol*. 17: 875—9.
- Laohapan A., Nuwatkrisin K., Ratchanon S. & Usawachintachit M., 2020.** Study of urinary stone composition in a university-based hospital. *Insight UROLOGY*. 41(2): 48-56.
- Laziri F., Rhazi Filali F., Oussama A., Soulaymani A., Qarro A. & Lezrek M., 2009.** Facteurs impliqués dans l'épidémiologie des calculs urinaires marocains. *J Maroc Urol*. 0-19.
- Lee Y.H., Huang W.C., Tsai J.Y., Lu C.M., Chen W.C. & Lee M.H., 2002.** Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urol Int*. 68:172–7.
- Lerner S.P., Gleeson M.J. & Griffith D.P., 1989.** Infection stones. *J Urol*. 141(3 Pt 2): 753-8. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)41002-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)41002-0)
- Letavernier E. & Daudon M., 2016.** La plaque de Randall: à l'origine des calculs rénaux. *Bull. Acad. Natle Méd.* 200 (6) : 1129-1140. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30634-X](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30634-X)
- Leusmann D.B., 1982.** Premiers résultats synthétiques de l'analyse combinée des phases et de la structure des calculs urinaires par diffraction des rayons X et microscopie électronique à balayage. *Pathog. Klin. Harnsteine*, 8, p. 275°.
- L'huillier D.Y., Jobé C., Emonet S., Defabiani N., Gobin N. & Fournier J., 2019.** La pyélonéphrite aiguë chez l'adulte : pour une prise en charge unifiée. *Rev Med Suisse*. 15 : 1545-50
- Li H., Yao Q.Z., Wang Y.Y., Li Y.L. & Zhou G.T., 2015.** Biomimetic synthesis of struvite with biogenic morphology and implication for pathological biomineralization. *Scientific reports*. 5(1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep07718>
- Li H., Yao Q.Z., Yu S.H. & Huang Y.R., 2017.** Bacterially mediated morphogenesis of struvite and its implication for phosphorus recovery. *Am. Mineral*. 102, 381–390
- Lieske J.C., Peña de la Vega L.S., Slezak J.M., Leibson C.L., Ho K.L. & Gettman M.T., 2006.** Renal stone epidemiology in Rochester, Minnesota: an update. *Kidney Int*. 69(4):760–764. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000150>

- Liu Y., Chen Y., Liao B., Luo D., Wang K & Li H., 2018.** Epidemiology of urolithiasis in Asia. *Asian J Urol.* 5(4):205–14. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2018.08.007>
- Lomas D.J., Jaeger C.D. & Krambeck, A.E., 2017.** Profile of the ammonium acid urate stone former based on a large contemporary cohort. *Urology.* 102: 43–47.
- López-Carreras N, Fernández-Vallinas S, Hernández R., Miguel M. & Aleixandre A., 2013.** Short-term effect of an aqueous *Fraxinus excelsior* L. seed extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Res Int.*53 (1):81–7. Doi: 10.1016/j.foodres.2013.03.050.
- Luo Y., Li H., Huang Y.R., Zhao T.L., Yao Q.Z., Fu S.Q. & Zhou G.T., 2018.** Bacterial mineralization of struvite using MgO as magnesium source and its potential for nutrient recovery. *Chem. Eng. J.* 351: 195–202.
- Lust J., 1974.** The Herb Book Benedict Lust Publications, USA.pp: 298-300.
- Maghrani M., Zeggwagh N., Lemhadri A., El Amraoui M., Michel J. & Eddouks M., 2004.** Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 91. .
- Mahboubi M., Mahdizadeh E. & Heidary R.T., 2019.** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Fraxinus excelsior* L. Seeds Essential Oil. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*14 (1):e61105. [doi: 10.5812/jjnpp.61105.](https://doi.org/10.5812/jjnpp.61105)
- Manassero M., Decambon A., Benchekroun G., Stambouli F., Leperlier D., Viateau V., Fayolle P., Moissonnier P. & Maurey C., 2014.** Traitement des lithiases urétérales obstructives par la mise en place de stents pyélo-vésicaux chez le chat. *Revue vétérinaire clinique.* 49 :13—22.
- Manfredini R., Giorgi De.A., Storari A. & Fabbian F., 2016.** Pears and renal stones: possible weapon for prevention? A comprehensive narrative review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 20: 414-425.
- Mann S., 2007.** Mineralization in biological systems. *Inorganic Elements in Biochemistry.* 54: 125–174.
- Manzoor M.A.P., Balwant S., Ashish K.A., Ananthapadmanabha B.A., Mujeeburahiman M. & Punchappady-Devasya R., 2018.** Morphological and micro-tomographic study on evolution of struvite in synthetic urine infected with bacteria and investigation of its pathological biomineralization. *Polos one.*1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202306>
- Manzoor M.A.P., Duwal S.R, Mujeeburahiman M. & Rekha P.D., 2018.** Vitamin C inhibits crystallization of struvite from artificial urine in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *International braz j urol.* 44(6):1234-1242. <https://doi.org/10.1590/S1677>
- 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.
- Masoko P., Gololo S.S., Mokgotho M.P., Eloff J.N., Howard R. & Mampuru L., 2010.** Evaluation of the antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of the acetone extract of the roots of *Senna italica* (Fabaceae), *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 7:138–148.

- Maurice-Estépa L., Levillain P., Lacour B. & Daudon M., 1999.** Crystalline phase differentiation in urinary calcium phosphate and magnesium phosphate calculi. *Scand J Urol Nephrol.* 33: 299-305. DOI: 10.1080/003655999750017365
- Maxime R., 1996.** Exploration métabolique de la lithiase oxalo-calcique urinaire. Les indicateurs du risque lithogène : Modalités, applications et perspectives *Progrès en Urologie.* 6, 44-51.
- McLean R.J., Downey J., Clapham L. & Nickel J.C., 1990.** A simple technique for studying struvite crystal growth in vitro. *Urol Res.* 18: 39 – 43.
- McLean R.J. & Nickel J.C., 1994.** Glycosaminoglycans and struvite calculi. *World J Urol.* 12:49-51.
- McLean R.J., Nickel J.C., Noakes V.C. & Costerton J.W., 1985.** An in vitro ultrastructural study of infectious kidney stone genesis, *Infect. Immun.* 49: 805–811.
- Mechraoui O., Imessaoudene A., Maiz M.Y., Banouh Hicham., Mouni L., Rebiai A., Belfar M.L. & Ben Seghir B., 2021.** In vitro Antiurolithiatic activity of the Leaves and Flowers extracts of *Paronychia argentea*, a plant used in Traditional medicine in Algeria. *Asian J. Research Chem.* 14(6): November – December DOI: 10.52711/0974-4150.2021.00069
- Meria P. & Jungers P., 2000.** Encrusted pyelitis: an underdiagnosed condition? *Nephrol Dial Transplant.* 15: 943-945.
- Meria P. & Jungers P., 2008.** Pyélite incrustantes : un diagnostic précoce facilite la prise en charge conservatrice. *Presse Méd .* 3: 85-87.
- Meyer B., Schneider W. & Elstner E.F., 1995.** Antioxidative properties of alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arznei mittel-Forschung* 45: 174–176.
- Meyers A.M., 2021.** Nephrolithiasis (parts 1 and 2). *S Afr Med J.* 111(10):928-929. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2021.v111i10.15991>
- Miano R., Germani S. & Vespasiani G., 2007.** Stones and urinary tract infections. *Urol Int.* 79 (Suppl.1):32-6. DOI: 10.1159/000104439.
- Middleton P., Stewart F, Al-Qahtani S., Egan P., O'Rourke C. & Abdulrahman A., 2005.** Antioxidant, Antibacterial Activities and General Toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2: 81-86
- Middleton P., Stewart F., Al-Qahtani S., Egan P., O'Rourke C. & Abdulrahman A., 2010.** Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iran J Pharm Res.* 4(2):101–3.
- Middleton P., Stewart F., Al-Qahtani S., Egan P., O'Rourke C., Abdulrahman A., Middleton B.M., M., Kumarasamy Y., Shoeb M., Nahar L., Delazar A. & Sarker S., 2005.** Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iran. J. Pharm. Res.* 2: 81– 86. <https://dx.doi.org/10.22037/ijpr.2010.620>

- Millán F., Gracia S., Sánchez-Martín F.M., Angerri O., Rousaud F. & Villavicencio H., 2011.** New approach to urinary stone analysis according. *Actas Urológicas Españolas*. 35 (3):138-143
- Morgan M.S & Pearle M.S., 2016.** Medical management of renal stones. *BMJ*. 352:i52. <https://doi.org/10.1136/bmj.i52>
- Mukul S.A., Uddin M.B. & Tito M.R., 2007.** Medicinal plant diversity and local healthcare among the people living in and around a conservation area of Northern Bangladesh. *Int J Usufructs Manag.* 8(2): 50-63.
- Muryanto S., Sutanti S. & Kasmiyatun M., 2015.** Inhibition of struvite crystal growth in the presence of herbal extract orthosiphon aristatus BL. MIQ. In MATEC Web of Conferences. Vol. 58, p. 01013. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20165801013>
- Nair R., Kalariya T. & Sumitra C., 2005.** Antibacterial Activity of Some Selected Indian. *Medicinal Flora Turk J Biol.*29 (2005) 41-47
- Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. & Krishna D.R., 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacology, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. harm.* 33:8-16.
- Neeraja K.U., Ganga R.B. & Venkateswara R.B., 2017.** Comparison of In vitro Antiuro lithiatic Activity of *Aerva lanata*, *Sphaeranthus indicus*, *Merremia emarginata*. *Research J. Pharm. and Tech.* 10 (6): 1653-1656. doi: 10.5958/0974-360X.2017.00291.8
- Nemoy N.J. & Stamey, T.A., 1971.** Surgical bacteriological and biochemical management of “infection stones.” *J. Am. Med. Assoc.* 215: 1470–1476.
- Netelenbos J.C., Zwijnenburg P.J. & ter Wee P.M., 2005.** Risk factors determining active urinary stone formation in patients with urolithiasis. *Clin Nephrol.* 63: 188—92.
- Nikaido H., 2003.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67(4): 593-656.
- Nickel J.C., Costerton J.W., McLean R.J. & Olson M., 1994.** Bacterial biofilms: Influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 33 (Suppl. A):31–41.
- Nickel J.C., Emtage J. & Costerton J.W., 1985.** Ultrastructural microbial ecology of infection-induced urinary stones. *J Urol.* 133:622-7.
- Nicolle L.E., 2001.** Urinary tract pathogens in complicated infection and in elderly individuals. *J Infect Dis.* 183: S5-S8.
- Nielubowicz G.R. & Mobley H.L., 2010.** Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Rev Urol.* 7: 430–441.
- Ninan S., Walton C. & Barlow G., 2014.** Investigation of suspected urinary tract infection in older people. *BMJ.* 349:g4070.

**Nora N.B., Hamid K., Snouci M., Boumediene M. & Abdellah M., 2012.** Antibacterial activity and phytochemical screening of *Olea europaea* leaves from Algeria, Open Conf. Proc. J. 3: (1) 66–69 (Suppl 1-M11).

**Okpanyi S.N., Schirpke-von P.R. & Dickson D., 1989.** Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effect of various plant extracts and their combinations in an animal model. *Arznei mittel-Forschung*. 39(6): 698–703. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2476136/>

**Omar N.B., Gonzalez-Muñoz M.T. & Arias J.M.P., 1998.** Struvite crystallization on *Myxococcus* cells, *Chemosphere*. 36 (3): 475–481.

**Ozaki A.N., Minh K.Y., Huynh T.N., Nguyen T.H., Bui Q.L., Nguyen T.Q.H., Chitsan L. & Tran T.T., 2022.** Investigation of Nitrogen and Phosphorus Recovery from Swine Wastewater by Struvite Crystallization. *J. Fac. Agr.* 67(1): 65–74.

**Palombo E.A. & Semple S.J., 2001.** Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *J Ethno Pharmacol*. 77:151e157.

**Pastor. & Chabanne., 2007.** Analyse : savoir mettre en évidence et interpréter une cristallurie. *Nouv Prat Vet, canine féline*. 3: 506-8.

**Penniston K.L., 2021.** Diet and kidney stones: The ideal questionnaire. *Eur Urol Focus*. 7:9-12.

**Pliûra, A. & Heuertz, M., 2003.** Technical Guidelines for Genetic Conservation: Common Ash (*Fraxinus excelsior*). European Forest Genetic Resources Programme Rome. 2 pp.

**Polito M., Minardi D., Montari M.P. & Varaldo P.E., 1987.** Adherence of gram-negative uropathogens to human uroepithelial cell. *Eur Urol*. 13(1-2): 74-78.

**Pozdzik A., Haute C.V., Maalouf N., Letavernier E., Williams J.C. & Sakhaee K., 2021.** “Trust my morphology”, the key message from a kidney stone. *Urolithiasis*. 49: 493–494. DOI <https://doi.org/10.1007/s00240-021-01280-4>

**Pozdzik A., Maalouf N, Letavernier E., Brocheriou I., Body J.J. & Vervaeet B., 2019.** Meeting report of the “Symposium on kidney stones and mineral metabolism: calcium kidney stones in 2017.” *J Nephrol*. 32:681–698. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00587-1>

**Prezioso, D., Illiano, E., Piccinocchi, G., Cricelli, C., Piccinocchi, R. & Saita, A., 2014.** Urolithiasis in Italy: an epidemiological study. *Arch Ital Urol Androl*. 86:99–102.

**Prywer J., Ewa M.B. & Marcin O., 2015.** Struvite crystal growth inhibition by trisodium citrate and the formation of chemical complexes in growth solution. *Journal of Crystal Growth*. 418: 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2015.02.027>

**Prywer J. & Olszynski, M., 2017.** Bacterially induced formation of infectious urinary stones: recent developments and future challenges. *Curr. Med. Chem*. 24, 292–311.

**Prywer J. & Torzewska A., 2009.** “Bacterially induced struvite growth from synthetic urine: experimental and theoretical characterization of crystal morphology”. *Crystal Growth and Design*. 9(8): 3538–3543. <https://doi.org/10.1021/cg900281g>

**Prywer J. & Torzewska A., 2010.** Biomineralization of struvite crystals by *Proteus mirabilis* from artificial urine and their mesoscopic structure. *Cryst. Res. Technol.* 45, No. 12, 1283 – 1289. DOI 10.1002/crat.201000344

**Prywer J. & Torzewska A., 2012.** Effect of Curcumin Against *Proteus mirabilis* During Crystallization of Struvite from Artificial Urine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 862794, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2012/862794>

**Prywer J. & Torzewska A., 2019.** Aggregation of poorly crystalline and amorphous components of infectious urinary stones is mediated by bacterial lipopolysaccharide. *Sci. Rep*9:17061.

**Prywer J., Torzewska A., 2019.** Impact of bacteria on aggregation of crystalline and amorphous components of infectious urinary stones. *J. Cryst. Growth*. 506, 71–78.

**Qaader D.S., Yousif S.Y. & Mahdi L.K., 2006.** Prevalence and etiology of urinary stones in hospitalized patients in Baghdad. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 12, 6:853-861.

**Qin Y., Luo Z.Q., Smyth A.J., Gao P., von Bodman S.B. & Farrand S.K.,** Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *EMBO J*. 19:5212–21.

**Ragaa H.M., Salama A.A., Marwa S.M. & Alaa E., 2012.** La protéine morphogénétique osseuse 2 sera un nouveau marqueur biochimique dans les infections des voies urinaires et la formation de calculs. *Biochimie Clinique*. 45: 766–769.

**Rahman N.U., Meng M.V., & Stoller M.L., 2003.** Infections and urinary stone disease. *Curr. Pharm. Des.* 9:975–981.

**Ramadevi S., Kaleeswaran B. & Ilavenil S., 2020.** Effect of traditionally used herb *Pedaliumpurex* L. and its active compound pedalitin on urease expression – For the management of kidney stone. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27(3):833–839. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.014>

**Ratkalkar V.N. & Kleinman J.G., 2011.** Mechanisms of stone formation. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 9:187–197.

**Rawat S. & Swarup., 2015.** Antimicrobial activity of Ayurvedic herbs against urinary tract infection pathogens. *J Chem Pharm Res*. 4:1461e1465.

**Reshma R., Mahima V., Badrinathan S., Himaja M., Sabina E.P. & Arunai Nambi R.N. 2014.** In vitro and In vivo study on the effect of *Scoparia Dulcis* in inhibiting the growth of urinary crystals. *International Journal of Phytomedicine*. 6: 617–624.

**Rieu P., 2005.** Lithiases d'infection. *Annales d'urologie.* 39: 16–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.anuro.2005.01.001>

**Rigling D., Hilfiker S., Schöbel C., Meier F., Engesser R. & Scheidegger C., 2016.** Le dépérissement des pousses du frêne Biologie, symptômes et recommandations pour la gestion Notice pour le praticien. WSL Birmensdorf. Not. prat. 57.

**Ritz E., Hahn K., Ketteler M., Kuhlmann M.K. & Mann J., 2012.** Phosphate additives in food—a health risk, *Dtsch. Ärztebl. Int.* 109: 49–55.

**Rivadeneyra M.A., Gutierrez-Calderon A. & Ramos-Cormenzana A., 1999.** A study of struvite precipitation and urease activity in bacteria isolated from patients with urinary infections and their possible involvement in the formation of renal calculi. *Urol Int.* 63:188-92.  
<https://doi.org/10.1159/000030445>

**Rivadeneyra M.A., Pérez-García I. & Ramos-Cormenzana A., 1992.** Struvite precipitation by soil and fresh water bacteria. *Curr Microbiol.* 24: 343–347.

**Rivadeneyra M.A., Perez-Garcia I. & Ramos-Cormenzana A., 1993.** The effect of incubation temperature on struvite formation by bacteria. *Folia Microbiol.* 38: 5–9.

**Rizzi T.E., Valenciano A., Bowles M., Cowell R., Tyler R. & De N., 2017.** Atlas of Canine and Feline Urinalysis. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc. Published, USA.  
doi:10.1002/9781119365693.ch4

**Rodgers A.L., 2017.** Physicochemical mechanisms of stone formation. *Urolithiasis.* 45:27–32.

**Roger C., Abid N., Dubourg L., Auvergnona C., Lemoinec S. & Machon C., 2020.** Composition of urinary calculi: Lessons from a French epidemiologic retrospective study. *Progrès en urologie.* 30: 339-345. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2020.03.003>

**Romero V., Akpınar H. & Assimos D.G., 2010.** Kidney stones: A global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol.* 12:e86–e96.

**Roupret M., Hupertan V., Daudon M., Lebrun S., Sebe P, Gattegno B., Thibault F. & Traxer O., 2005.** Intérêt de l'analyse morpho-constitutionnelle par spectrophotométrie infra-rouge des incrustations des sondes double J pour la détermination indirecte de la composition des calculs urinaires. *Prog Urol.* 15 (3): 411-415.

**Rozalski A., Sidorczyk Z. & Kotelko K., 1997.** Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 65–89.

**Rushfort K., 2006.** Reconnaître les arbres sans peine. Edition Nathan, 288 p.

**Sahraoui H.L., Qasmaoui A., Charof R., Hamamouchi J. & Berny E.H., 2021.** Antibacterial power of *Olea Europaea* extracts from different Moroccan regions. *E3S Web of Conferences.* 319, 01067. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202131901067>

**Sadki C. & Atmani F., 2017.** Évaluation de l'effet antilithiasique, oxalo-calcique et phospho ammoniac-magnésien d'extrait aqueux d'*Erica multiflora* L. *Progrès en urologie.* 27(16): 1058–1067. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2017.09.011>

**Sadowski R.R., Prywer J. & Torzewska A., 2014.** Morphology of struvite crystals as an evidence of bacteria mediated growth. *Cryst. Res. Technol.* 49, 478–489.

- Salman A., Muhammad M.H. & Zafar A.M., 2016.** Antiurolithiatic plants: Multidimensional pharmacology. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5(2): 04–24.
- Safarinejad M.R., 2007.** Adult urolithiasis in a population-based study in Iran: prevalence, incidence, and associated risk factors. *Urol Res*. 35(2):73–82.
- Sakamoto S., Katsuhito M., Takahiro Y. Taro I., Misuzu F., Hiroaki N. & Takuro Ma., 2019.** Chronological changes in epidemiological characteristics of lower urinary tract urolithiasis in Japan. *Int. J. Urol*.26: 96–101. <https://doi.org/10.1111/iju.13817>.
- Sakhaee K., Maalouf N.M. & Sinnott B., 2012.** Kidney stones: patho-genesis, diagnosis, and management. *J Clin Endocrinol Metab*. 97:1847—60.
- Saljoughian M., 2020.** The Management of Urolithiasis *US Pharm*. 45(9):34-36.
- Sánchez-Román M., Rivadeneyra M.A., Vasconcelos C. & McKenzie J.A., 2007.** Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol*. 61:273–284.
- Saussine C., Lechavallier E. & Traxer O., 2008.** Calculs coralliforme ou calcul complexes: considération médicales. Elsevier Masson. 18 : 963- 965.
- Saussine C., 2008.** La lithogénèse. Elsevier Masson. 18, pp : 815-827.
- Saynab R.A., Ayansina S.A & Ramokoni E.G., 2020.** Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Olea europaea* subsp. *africana* against pathogenic microorganisms. *Scientific African*. 10: e00548.  
<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00548>
- Scales C.D.J., Smith A.C., Hanley J.M. & Saigal C.S., 2012.** Prevalence of kidney stones in the United States. *Eur Urol*. 62:160–5.
- Schepers M.S., van der Boom B.G., Romijn J.C., Schroder F.H. & Verkoelen C.F., 2002.** Urinary crystallization inhibitors do not prevent crystal binding. *J Urol*. 167:1844–1847.
- Scott M.D., Andrew J.R. & Damien M.B., 2001.** Gastric patch pyeloplasty: development of an animal model to produce upper tract urinary acidification for treating struvite urinary calculi, *J. Urol*. 166 (2): 684–687.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)66043-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)66043-0)
- Serio A. & Fraioli A., 1999.** Epidemiology of nephrolithiasis. *Nephron*. 81:26–30.
- Siener R., 2006.** Impact of dietary habits on stone incidence, *Urol Res*. 34: 131-133.
- Siener R., Struwe F. & Hesse A., 2016.** Effect of L-Methionine on the Risk of Phosphate Stone Formation. *Urology*; 98:39-43. doi: 10.1016/j.urology..08.007.
- Shaw G.L., Choong S.K. & Fry C., 2005.** Encrustation of biomaterials in the urinary tract. *Urol Res*. 33:17-22. DOI: 10.1007/s00240-004-0423-9.
- Simoës, F., Vale, P., Stephenson, T. & Soares, A., 2018.** Understanding the growth of the bio-struvite production *Brevibacterium antiquum* in sludge liquors. *Environ. Technol*. 39: 2278–2287

**Sinha A., Singh A., Kumar S., Kumar K.S. & Ramanan A., 2014.** Microbial mineralization of struvite: a promising process to overcome phosphate sequestering crisis. *Water Res.* 54, 33–43.

**Singh A.K. & Solanki S., 2022.** Antimicrobial activity of *Nyctanthes arbor-tristis* against *Staphylococcus aureus*, *Ptrepococcus pyogens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi*. *IJPSR.* 2022; Vol. 13(7): 2744-2752. DOI: [10.13040/IJPSR.0975-8232.13\(7\).2744-52](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13(7).2744-52)

**Singh Baghel D, Mittal A., Singh S., Chaudhary A.K., Bhatia A. & Shruti C., 2021.** Formulation, Evaluation and Assessment of In Vitro Potential of Gokshur Ghan Tablet against Urolithiasis (Mutrakrichra). *Research Journal of Pharmacy and Technology.* 14(4):1945-2. Doi: 10.52711/0974-360X.2021.00344

**Singh Rana Gopal., Sanjeev K.B. & Kumar R., 2010.** Litholytic Property of Kulattha (*Dolichous Biflorus*) vs Potassium Citrate in Renal Calculus Disease: A Comparative Study. *JAPI.* 58: 287.

**Singh V.K. & Rai P.K., 2014.** Kidney stone analysis techniques and the role of major and trace elements on their pathogenesis: a review, *Biophys. Rev.* 6: 291–310.

**Slinkard K. & Singleton V.L., 1977.** Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture.* 28(1): 49-55.

**Soares A., Veeram M., Simoes F., Wood E., Parsons S.A. & Stephenso T., 2014.** Biostruvite: a new route to recover phosphorus from wastewater. *Clean Soil Air Water.*42: 994–997.

**Sofer M. & Denstedt JD., 2000.** Encrustation of biomaterials in the urinary tract. *Curr Opin Urol.* 10:563-9. DOI: 10.1097/00042307-200011000-00005

**Sohshang H.L, Singh M.A, Singh N.G. & Singh S.R. 2000.** Biochemical and bacteriological study of urinary calculi. *J Commun Dis.* 32: 216-21.

**Soundararajan P., Mahesh R., Ramesh T. & Hazeena B.V., 2006.** Effect of Aerva Lanata on calcium oxalate urolithiasis in rats. *Indian journal of experimental biology.* 44: 981-986.

**Spandana K., Shivani M., Himabindhu J. & Ramanjaneyulu K., 2018.** Evaluation of In Vitro Antiurolithiatic Activity of *Vigna radiata*. *Research J. Pharm. and Tech.* 11(12): 5455-5457. Doi: 10.5958/0974-360X.2018.00994.0

**Suschka J., Machnicka A. & Poplawski S., 2001.** Phosphates Recovery from Iron Phosphates Sludge. *Environmental Technology.* 22 (11): 1295-1301. <https://doi.org/10.1080/09593330409355432>

**Sujoy B., 2013.** Potential clinical significance of urease enzyme. *European Scientific Journal.* 9(21): 94-102.

**Sun X., Shen L., Cong X., Zhu H., He L. & Lu J., 2011.** Infrared spectroscopic analysis of 5,248 urinary stones from Chinese patients presenting with the first stone episode. *Urol Res.* 39(5):339–43.

**Suresh R. & Das K., 2013.** *Essentials of Human Physiology*, 4th edition, Books And Allied (P) Ltd. 1: 223-230.

**Swapnil R.L., Avinash B.D. & Ravindra B.S., 2016.** Pharmaceutical Co-Crystallization. Asian J. Res. Pharm. Sci. 6(1): Jan.-Mar. Page 51-58. doi: 10.5958/2231-5659.2016.00008.4

**Tae B.S., Balpukov U., Cho S.Y. & Jeong C.W., 2018.** Eleven-year cumulative incidence and estimated lifetime prevalence of urolithiasis in Korea: A National Health Insurance Service National Sample Cohort Based Study. J. Korean Med. Sci. 33, e13. <https://doi.org/10.3346/jkms>.

**Tahiri O., Atmani D. & Atmani D., 2016.** Caracterisation de l'activite anti-bacterienne des extraits de pistacia lentiscus et de fraxinus angustifolia. Substances Naturelles et Innovations Thérapeutiques. 41-45

**Tahirović A. & Bašić N., 2016.** Determination of phenolic content and antioxidant capacity of *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. Leaves and Bark extracts. Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo. 1 (29-41)29 UDK 581.19: 547.56 : 582.916.16.

**Tefekli A. & cezayrli F., 2013.** The history of urinary stone: in parallel with civilization. Scientific World Journal. 423964.

**Tenke P.B., Kovacs M.J. & Nagy E., 2006.** The role of biofilm infection in urology. World J Urol. 24: 13–20. [DOI 10.1007/s00345-005-0050-2](https://doi.org/10.1007/s00345-005-0050-2)

**Thomas B. & Tolley D., 2008.** Concurrent urinary tract infection and stone disease: pathogenesis, diagnosis and management. N at Clin Pract Urol. 5: 668 – 75  
DOI: 10.1038/ncpuro1254

**Thomas S., Ethan M. & Weiner R.T.C., 2011.** Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol. 82(5): 1044–1059.  
[doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07887](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07887).

**Tilahun A. & Beyene P., 2018.** Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts. Advances in Urology; Article ID 3068365, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/3068365>

**Tiță I., Mogoșanu G.D. & Tiță M.G., 2009.** Ethnobotanical Inventory of Medicinal Plants from the South-West of Romania. FARMACIA; 57 (2): 141-156.

**Toda M., Okubo S., Iki H., Suzuki T., Suzuki Y. & Shimamura T., 1991.** The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* O1. J. Appl. Bacteriol.70:109-112.  
[doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb04435.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04435.x).

**Torzewska A. & Rozalski A., 2014.** Inhibition of crystallization caused by *Proteus mirabilis* during the development of infectious urolithiasis by various phenolic substances. Microbiological research. 169(7-8): 579-584. <https://doi.org/10.1016/>

**Torzewska A., Stańczek P. & Różalski A., 2003.** Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharides. Journal of Medical Microbiology. 52(6):471–477. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05161-0>

**Traxer, O., 2012.** Lithiase urinaire : bilan métabolique et prévention. *Progrès en urologie*. 22, 876—880.

**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. *Eur Urol*. 37:23–5.

**Tsujihata M., 2008.** “Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury”. *International Journal of Urology*. 15(2):115-120.

**Türkgluet A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I. & Gezer K., 2007.** Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *A Food Chemistry*. 101(1):267–273.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.025>

**Uniyal S.K., Singh K.N, Jamwal P. & Lal B., 2006.** Traditional use of medicinal plants among the tribal communities of Chhota Bhangal, Western Himalayan. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2:1e14.

**Van D.G., 2001.** Human Anatomy, Sixth Edition, Brian Black. *Medical Anatomy and Physiology*. Unit 11: Urinary System. pp: 1-5.

**Van Vuuren S.F., Suliman S. & Viljoen A.M., 2009.** The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett.Appl. Microbiol*. 48: 440–446. [DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x)

**Vermuelen C.W. & Goetz R., 1954.** Experimental urolithiasis: IX. Influence of infection on stone growth in rats, *J. Urol*. 72: 761–769.

**Verma K, Akhtar M.J. & Anchliya A., 2021.** Combination of FTIR Spectroscopy and Chemometric Method on Quantitative Approach - A Review. *Austin J Anal Pharm Chem*. 8 (1): 1128.

**Vidyashree B., Karunakar Hegde. & Shabaraya A.R., 2021.** Kidney Stone Disease: A Brief Review. *Acta Scientific Pharmacology*. 2 (2):17-21.

**Vincent C., François J., Olivier B., Bernard D., Alexandre T., David W., Anne-Catherine B., Étienne C. & Romy G., 2015.** Épidémiologie de la lithiase urinaire en Belgique sur base d’une classification morpho constitutionnelle. *Néphrologie et thérapeutique*. 11(1): 9-42.

<https://doi.org/10.1016/j.nephro.2014.08.003>

**Visen P, Saraswat ., Visen A., Roller M., Bily A. & Mermet C., 2009.** Acute effects of *Fraxinus excelsior* L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers; *Journal of Ethnopharmacology*.126: 226–232.

**Vivek K.S & Pradeep K.R., 2014.** Kidney stone analysis techniques and the role of major and trace elements on their pathogenesis: a review. *Biophys Rev*. 6:291–310. DOI 10.1007/s12551-014-0144-4.

**Vlietinck A.J., Van Hoof L. & Tott J., 1995.** Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *J. Ethnopharmacol.* 46: 31-47.

**Von Kruedener S., Schneider W. & Elstner E.F., 1995.** “A combination of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior* as an anti-inflammatory and antirheumatic drug. A short review”. *Arzneimittel-Forschung* 1995; 45(2): 169–171.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7710441/>

**Von Kruedener S., Schneider W. & Elstner E., 1996.** Effects of extracts from *Populus tremula* L., *Solidago virgaurea* L. and *Fraxinus excelsior* L. on various myeloperoxidase systems. *Arzneimittel-Forschung*.46: 809–814.

**Vupputuri S., Michael S.J., Mcclellan W. & Sandler D.P, 2004.** History of kidney stones as a possible risk factor for chronic kidney disease. *AEP.* 14(3): 222e228.

**Wang H.H., Lin K.J., Chu S.H., Chiang Y.J. & Lin P.H., 2014.** The impact of climate factors on the prevalence of urolithiasis in Northern Taiwan, *Biomed J.* 34-24.

**Wang P., Zhang H., Zhou J., Jin S., Liu C., Yang B. & Cui L., 2021.** Study of risk factor of urinary calculi according to the association between stone compositions with urine component. *Scientific Reports.* 11: 8723 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87733-7>

**Wang Z., Zhang J.W., Zhang Y., Zhang S.P., Hu Q.Y. & Liang H., 2019.** Analyses of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in calcium oxalate monohydrate-stimulated renal tubular epithelial cells. *Urolithiasis.* 47:225–234.

**Weichhart T., Haidinger M., Horl W.H. & Säemann M.D., 2008.** Concepts actuels des mécanismes de défense moléculaire agissant lors d'une infection urinaire. *Eur J Clin Invest.* 38 (Suppl. 2):29–38.

**Westbury EG., 1974.** Some observations on the quantitative analysis of over 1000 urinary calculi. *Br J Urol.* 46:215-27. doi: 10.1111/j.1464-410x.1974.tb03746.x.

**Yoshiyuki Y., Hu Z.Q., Zhao W.H. & Shimamura T., 2004.** Different susceptibilities of *Staphylococcus* and gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *J. Infect. Chemother.*10:55-58. DOI: [10.1007/s10156-003-0284-0](https://doi.org/10.1007/s10156-003-0284-0)

**Zarasvandi A, Carranza E.J.M., Heidari M. & Mousapour E., 2014.** Environmental factors of urinary stones mineralogy, Khuzestan Province, Iran. *Journal of African Earth Sciences.* 97: 368–376. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2014.04.031>

**Zarasvandi A., Heidari M., Sadeghi M. & Mousapoor E., 2013.** Major and trace element composition of urinary stones, Khuzestan province, southwest, Iran *Journal of Geochemical Exploration.* 131: 52–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.08.014>

**Zalavadiya V., shah V. & Santani D.D., 2013.** A Review on Urolithiasis and its Treatment using Plants. *Research J. Pharmacognosy and Phytochemistry.* 5(1): 1-8.

**Zeng G., Mai Zanlin., Xia Shujie., Wang Zhiping., Zhang Keqin. & Wang Li., 2017.** Prevalence of kidney stones in China: An ultrasonography based cross sectional study. *BJU Int.* 120: 109-116. <https://doi.org/10.1111/bju.13828> (2017).

**Zhao, L.T., Li H., Huang Y.R., Yao Q.Z., Huang Y. & Zhou G.T., 2019.** Microbial mineralization of struvite: salinity effect and its implication for phosphorus removal and recovery. *Chem. Eng. J.* 358, 1324–1331.

**Zhao L.T., Li H., Jiang H.F., Yao Q.Z., Huang Y. & Zhou G.T., 2021.** Morphogenesis and evolution mechanisms of bacterially-induced struvite. *Scientific Reports.* 11:170 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80718-y>

**Zhao W.H., Z.Q. Hu, Okubo S., Hara Y. & Shimamura T., 2001.** Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*45:1737-1742. [DOI: 10.1128/AAC.45.6.1737-1742.2001](https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1737-1742.2001)

**Zhu H., Sun X., Lu J., Wang M., Fang Y. & Ge W., 2012.** The effect of plum juice on the prevention of struvite calculus formation in vitro. *BJU INTRNATIONA.* 110: E362-E367. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11090.x>

**Zhu W., Ying Z., Jianwen Z., Qiong D. & Hui L., 2021.** Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation (Review). *International Journal of Molecular Medicine.* 48(2): 1107-3756 <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4982>

**Ziemba J.B. & Matlaga B.R., 2017.** Epidemiology and economics of nephrolithiasis. *Investig Clin Urol.* 58:299–306.

# ***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

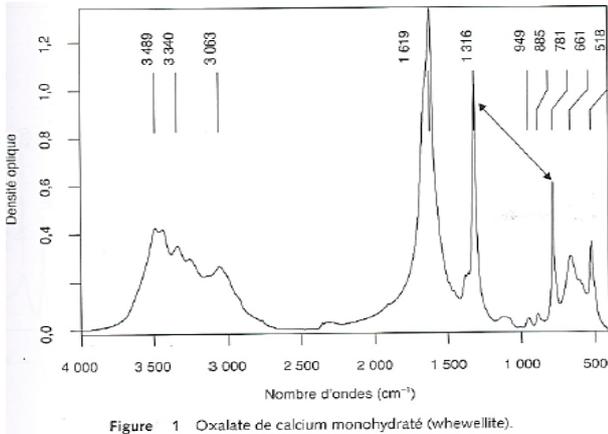


Figure 1 Oxalate de calcium monohydraté (whewellite).

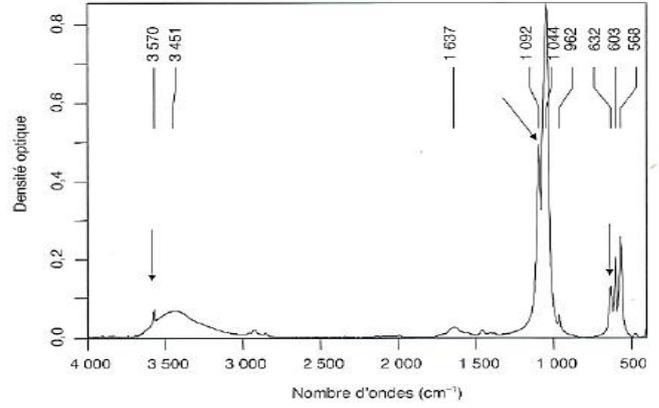


Figure 4 Hydroxyapatite.

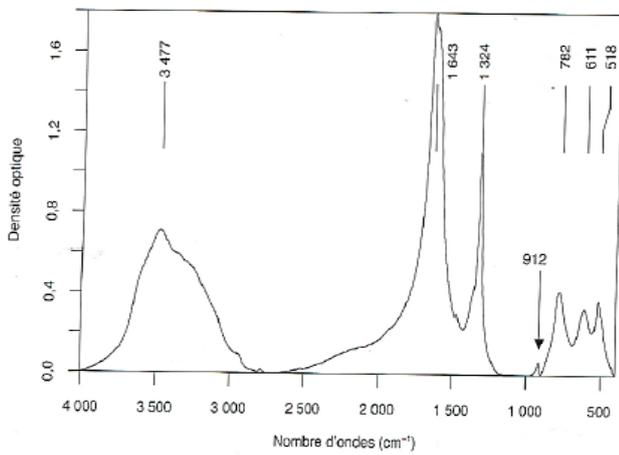


Figure 2 Oxalate de calcium dihydraté (weddellite).

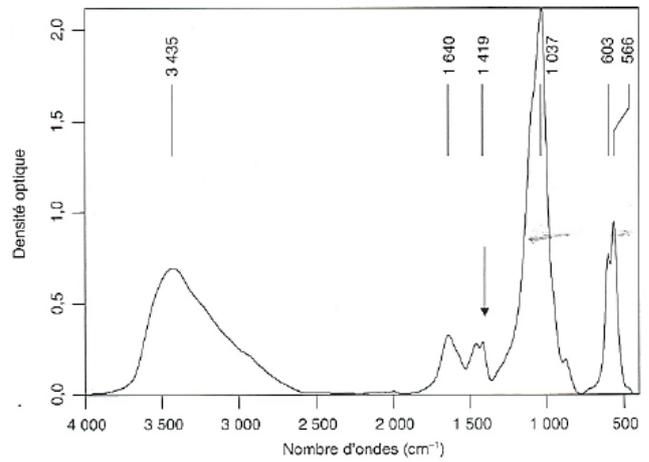


Figure 5 Carapatite.

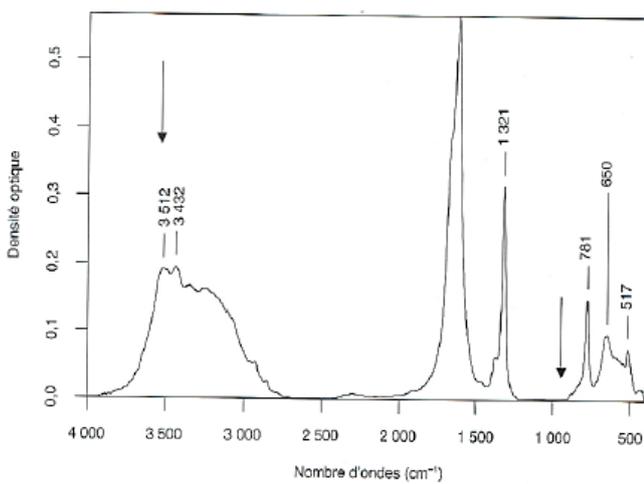


Figure 3 Oxalate de calcium trihydraté (caoxite).

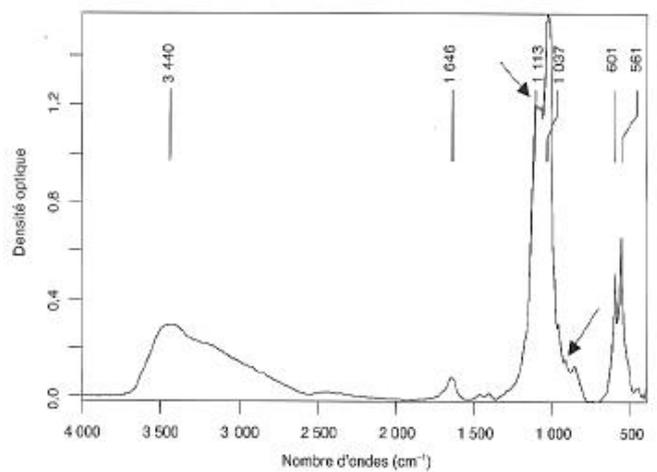


Figure 6 Phosphate octocalcique pentahydraté.

### 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 : ANTCD :

#### 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

Forme  
 Couleur  
 Dureté

#### CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES

Surface  
 Section  
 Noyau

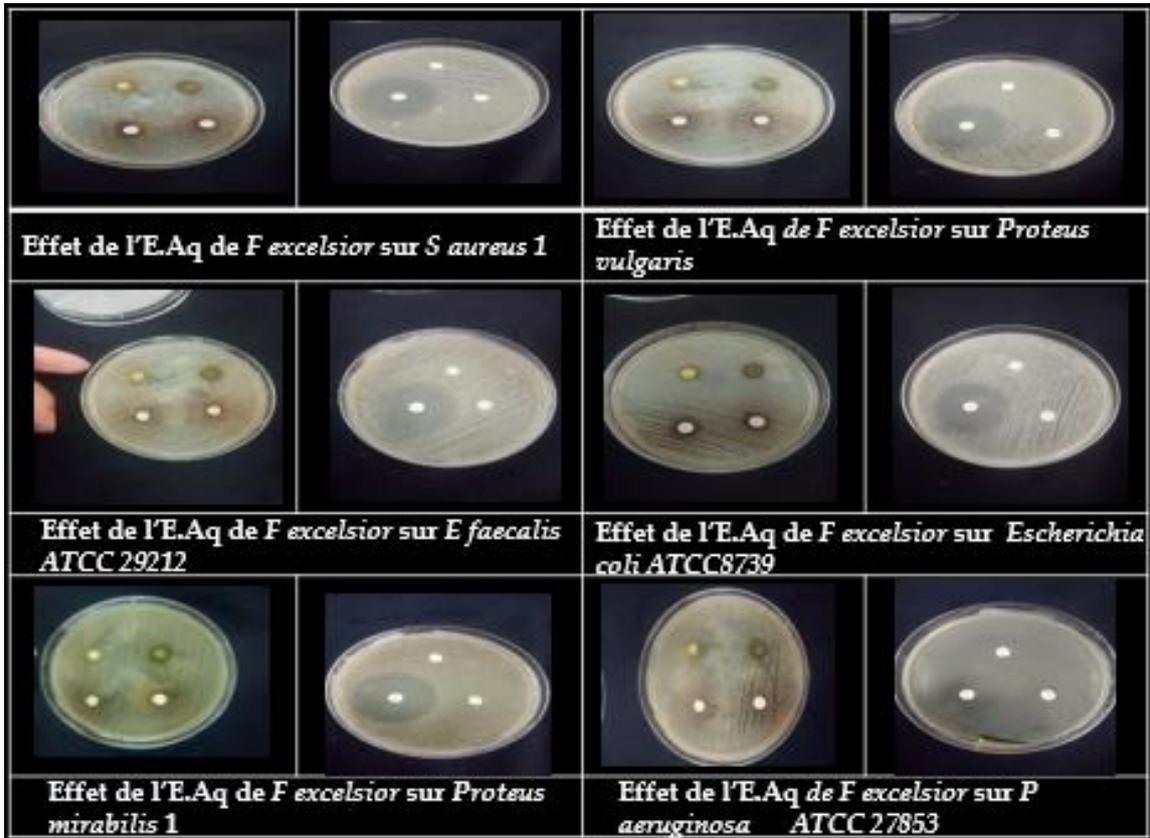
TYPAGE MORPHOLOGIQUE		SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE
Surface		
Section		
Noyau		
COMPOSITION DE LA POUDRE GLOBALE		

CONCLUSION :

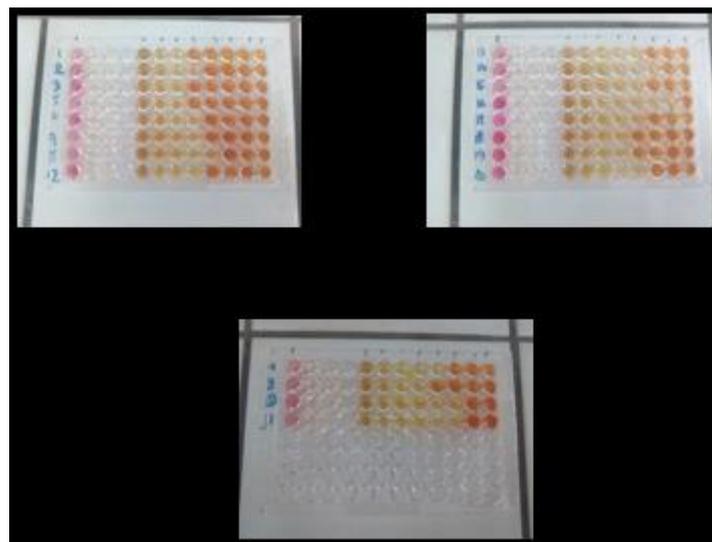
CAUSES HABITUELLES :

Fait à Annaba le : Jour/Mois/Année

ANNEXE 4



Evaluation qualitative de l'EAQ de *F excelsior* sur différentes souches



Evaluation qualitative de l'EAQ de *F excelsior* sur différentes souches

**Liste des**  
**publications et des**  
**communications**

## LISTE DES COMMUNICATIONS

### *Communications orales*

- **GHENAIET Khaoula**, LEKOUAGHET Asma, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, [Incidence et lithogénèse de la lithiase d'infection: Etude réalisée au niveau de la région « Est Algérien »](#). XVIIème Congrès de la SACU- VIème Congrès de la SALUDDPP- XIIèmes Journées de l'ASUR. Les 27-28 & 29 Avril 2017, Constantine.

### *Communications par affiche*

- **GHENAIET Khaoula**, LEKOUAGHET Asma, MECHRI Rym, KHAROUBI Latifa, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, CHOUAKRIA Atef, BOUKHIL Lokman, KADI Abdelkrim. [Les composants lithiasiques associés à la lithiase infectieuse de l'arbre urinaire : Etude réalisée au niveau de la région Est Algérien](#). Journées Urologiques Nationales d'Annaba (JUNA). Du 12 au 13 juin 2015, ANNABA.
- **GHENAIET Khaoula**, LEKOUAGHET Asma, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, [Impacte de l'infection urinaire sur la formation des calculs](#). 27 ème forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, Tunisie, du 28 au 31 mars 2016, Hammamet-TUNISIE, Association Tunisienne Des Sciences Biologique.
- **GHENAIET Khaoula**, LEKOUAGHET Asma, MECHRI Rym, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, KADI Abdelkrim. [Lithiase et infection urinaire](#). Journées Urologiques Nationales d'Annaba (JUNA). Du 13 et 14 mai 2016, ANNABA.
- **GHENAIET Khaoula**, BOUTEFNOUCHET Abdelatif. [Etude in vitro de la lithogénèse d'infection \(Struvite\)](#). VIème Congrès international de NEPHEROLOGIE. Le 20 & 21 Octobre 2017, Tlemcen.
- **GHENAIET Khaoula**, LEKOUAGHET Asma, BOUTEFNOUCHET Abdelatif, MECHRI Rym, ABASSI Nafissa, DAHDOUH Abderrezak. [Cristaux induits par des](#)

bactéries uréasiques dans des urines synthétiques. XVIII ème Congrès de la SACU & VII ème Congrès de la SALUDPP. Le 13 & 14 Avril 2018, Hôtel El-Aurassi Alger.

- **GHENAIET Khaoula, LEKOUAGHET Asma, BOUTEFNOUCHET Abdelatif.** La lithiase s'infection dans la région « Est-Algérien ». 9 ème Journées Urologique Nationales d'Annaba. Le 28-30 Octobre 2021.



**RESEARCH ARTICLE**

**Evaluation of the Antilithiasic activity, Phospho-ammoniac-magnésien of the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* (L.)**

**Khaoula Ghenaiet<sup>1</sup>, Abdelatif Boutefnouchet<sup>2,3\*</sup>, Asma Lekouaghet<sup>4</sup>,  
Nafissa Boutefnouchet Abassi<sup>4</sup>, Lazhari Tichati<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Badji Mokhtar Annaba University, 23000, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of Biophysics, Faculty of Medicine, Annaba, 23000, Algeria.

<sup>3</sup>Research Unit Materials Science and Applications, Constantine University, 25000, Algeria.

<sup>4</sup>Institute of Agronomic and Veterinary Sciences, Departement of Veterinary Medicine,  
University of Souk Ahras, 41000, Algeria.

<sup>5</sup>Environmental Research Center (ERC), Annaba, 23000, Algeria.

\*Corresponding Author E-mail: [delatif@yahoo.fr](mailto:delatif@yahoo.fr)

**ABSTRACT:**

The formation of urinary stones is a serious clinical problem in the world, the struvite of which is one of the characteristic components of urolithiasis of infectious origin. The objective of this study is to evaluate the *in vitro* litholytic and inhibitory effects of the leaf aqueous extract of *Fraxinus excelsior* L plant on the crystallization of struvite. The plant is commonly used in traditional Algerian medicine. A characterization method of *Fraxinus excelsior* L plant was first performed to determine the total phenolic and flavonoid compounds of *Fraxinus excelsior* L leaf aqueous extract. Struvite crystals prepared with two different processes had subsequently undergone an inhibition assay by supplementing Aqueous Extract with varying concentrations. In the first process, struvite was biologically crystallized in a synthetic urine in the presence of *Proteus mirabilis* during 24 hours of incubation period. This was followed by the addition of Aqueous Extract, the effect of which was evaluated after 1-hour. In the second process, struvite crystals were chemically synthesized for 30 minutes in the presence of aqueous extract. These two processes allow to assess, respectively, the litholytic effect of aqueous extract on the previously formed struvite crystals and the inhibitory effect of the crystallization of struvite. These various tests of crystallization and inhibition of struvite crystals were conducted by Polarized Light Microscopy (PLM) and Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. The results reveal that this Aqueous Extract contains an estimated total phenolic content of  $60.92 \pm 0.94$  mg gallic acid equivalent (GAE)/g of extract and a total flavonoid content of  $19.32 \pm 0.75$  mg quercetin equivalent (QE)/g of extract. The *in vitro* struvite crystals dissolution testing revealed a significant litholytic effect. Also, the struvite crystallization inhibition testing showed that it exerted a significant inhibitory effect observed with polarized light. The effect of this extract is evident against struvite crystals with a conclusive litholytic and inhibitory potential. The present results open up significant preventive management prospects for this type of lithiasis.

**KEYWORDS:** *Fraxinus excelsior*, Urinary Lithiasis, Struvite; Litholytic Effect, Crystal Inhibition.

**INTRODUCTION:**

The use of medicinal plants for the treatment of urinary tract calculi in Algeria, and especially in Africa, remains fairly anchored in popular practices where it constitutes the main curative basis<sup>1</sup>. In this sense, we have set ourselves the objective of evaluating the litholytic and inhibitory effects of a plant that is fairly well known in

the Algerian coast, called *Fraxinus excelsior* L, on the magnesium ammonium phosphate (PAM), commonly referred to as Struvite<sup>2-4</sup>.

Due to its abundance, *Fraxinus excelsior* L is identified among the medicinal plants used not only for its diuretic<sup>5</sup>, anti-inflammatory and antirheumatic<sup>6</sup>, antioxidant<sup>7</sup>, analgesic<sup>8</sup> antipyretic<sup>9</sup>, hypoglycemic<sup>10</sup>, hypotensive<sup>11</sup> effects but also cited for its litholytic effect<sup>12</sup> in the local pharmacopoeia. However, no study highlights its effect on the lithiasis infection, which is often associated with the formation of struvite. This type of lithiasis is the consequence of persistent and recurrent infections of the urinary tract<sup>13</sup>. It is generally caused by ureolytic microorganisms<sup>14-16</sup>, of which *Proteus mirabilis* is well known for its ability to produce active urease<sup>17</sup>. The latter converts urea into ammonia and carbon dioxide, which are respectively precursors for the formation of struvite and carbapate<sup>18-20</sup>. This process is accompanied by urinary alkalization, which allows a stabilization of these components<sup>21-23</sup>. In the situation of urolithiasis, infectious lithiasis is recurrent and difficult to treat due to the fact that the growth of struvite and/or carbonate apatite crystals take place around the microorganisms that provide protection and greatly improve the perpetuation of their urease activity<sup>24</sup>. Accordingly, the preventative aspect to deal with the infectious lithiasis and its recurrence so as to ensure, to the fullest extent, the litholytic and inhibitory effects of certain plants on this type of lithiasis, remains indeed a genuine eventuality.

## MATERIAL AND METHODS:

### Plant material:

The leaves of the *Fraxinus excelsior* plant (Figure. 1b) were harvested in March 2018 from the region of Seraidi (Province of Annaba; Eastern Algeria). This plant was identified by Pr. R., Mecheri; Botanist at the Faculty of Medicine -Badji Mokhtar Annaba University.

### Preparation of aqueous extract:

The aqueous extract was prepared by infusing 20 g of *Fraxinus excelsior* dried leaves in 200 ml of boiling distilled water for a period of 20 min. The filtrate was then evaporated in Rotary Evaporator (BUCHI, R215) at 40 ° C. Thus, the aqueous extract obtained was sealed in an airtight container and stored at 4°C until use. The yield is prepared according to the following equation<sup>25, 26</sup>:

$$R\% = (m/m_0) \cdot 100$$

R%: Percent yield

m: Mass of the dry residue remaining after evaporation in grams; and

m<sub>0</sub>: Mass of the sample before drying in grams.



Figure 1. (a) *Fraxinus excelsior* Tree and (b) *Fraxinus excelsior* Leaves

### Determination of Total Phenolic Content:

The total phenolic content of the extract was determined with Folin-Ciocalteu reagent (FCR) according to the method reported in Slinkard and Singleton<sup>27</sup>. This assay consists of preparing a first solution consisting essentially of 125 µl of aqueous extract, 500 µl of distilled water and 125 µl of FCR reagent. After 3 min, 1250 µl of 2% sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) and 1000 µl of distilled water were added, and the reaction mixture was stirred in the dark for 90 min. The absorbance was then measured by a spectrophotometer (DR2800, HACH LANGE) at a wavelength of 760 nm. The results are expressed in milligrams of gallic acid equivalent per gram of plant extract (mg GAE /g extract).

### Determination of Total Flavonoid Content:

The total flavonoid content of the extract was determined according to the protocol of Türkgluet et al<sup>28</sup>. A volume of 125 µl of aqueous extract is diluted in 2550 µl of methanol (CH<sub>3</sub>OH), 100 µl of potassium acetate solution (CH<sub>3</sub>COOK) and 100 µl of aluminum nitrate (Al (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) at 10%. After 40 min at room temperature, the absorbance was assessed at a wavelength of 415 nm and the total flavonoid concentration was expressed in milligrams of quercetin equivalent per gram of plant extract (mg QE /g extract).

### Dissolution of Struvite crystals:

The crystallization process was induced by the presence of *Proteus mirabilis* isolated from apatite with urolithiasis and then cultured on Tryptic Soy Broth (TSB) for 18-h at 37 ° C. This in-vitro crystallization process is similar to that which occurs during the in-vivo growth of struvite stones, as long as it is initiated by urease producing microorganisms.

The synthetic urine solution was prepared according to the recipe described by Agnieszka et al.,<sup>29</sup>. This synthetic urine is an aqueous solution containing in g/L the following components: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 0.651, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 0.651, NaCl: 4.6, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.3, Sodium Citrate: 0.65, Sodium Oxalate: 0.02, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2.8, KCl: 1.6, NH<sub>4</sub>Cl: 1.0, Urea: 25.0, Creatine: 1.1 and TSB: 10.0. The pH was initially adjusted to 5.8 and the prepared

urine was sterilized by filtration using a 0.22µm filter into sterile vials, and finally stored at 4 ° C for a 1-week before use. These mineral components correspond to the average concentration observed over a full normal 24-hour cycle. TSB had been added to stimulate bacterial growth without interfering with the precipitation process<sup>30</sup>. Crystallization occurs after addition of the suspension of *P. mirabilis* in 2ml of artificial urine at an appropriate concentration of 0.5 Mc Farland standard and an incubation at 37 ° C for 24 hours.

A volume of 62.5µl of aqueous extract was then added at various concentrations: 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5 and 1 mg/ml. The suspension of bacteria in synthetic urine without additives was prepared as a control. After 60min of incubation, a microscopic examination technique was carried out to compare the results obtained in the absence and presence of the tested extract. The pH measurements of each sample were carried out at the start and the end of the experiment.

#### Inhibition of Struvite crystallization:

The chemical synthesis of struvite crystals in the urine was performed according to the protocol of Sadki and Atmani<sup>31</sup>, which consists in mixing two solutions of respective composition:

- A: potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 0.1M.
- B: magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) 41g, ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) 50g; 20ml of ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) were added and diluted to 50ml with double-distilled water, then diluted 10 times.

The mixture of two volumes of 1ml each of these solutions was induced by adding 62.5µl of the plant extract to the solution “A”. The aqueous extract was prepared at different concentrations: 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; and 1mg/ml, and the control solution was prepared by replacing this extract with an equal volume of distilled water. After 30 min of incubation at 37 ° C, the growth of crystallized had been then monitored using PLM in all mixtures.

#### Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy:

The micrographic observations were followed by FTIR analytical technique. To help with this process, the residues of various concentrations were recovered by centrifugation at 4000rpm for 10min and then dried in the open air. Thus, each dried pellet was mixed with Potassium Bromide (KBr) at a rate of 0.5-1.0g per 100g of KBr in an agate mortar. The powder obtained was compressed to a pellet of 13 mm-diameter and 1mm-thickness. The technique was applied using a Bruker ALPHA II FTIR Spectrometer in the 4000-400 cm<sup>-1</sup> wave number range with a database used for analyzing the spectra by identifying the noticeable vibrations<sup>32, 33</sup>.

## RESULTS:

#### Extraction yield:

The mass extracted from *F. excelsior* plant leaves recovered after evaporation is 3.33g, which corresponds to an extraction yield of 16.7%.

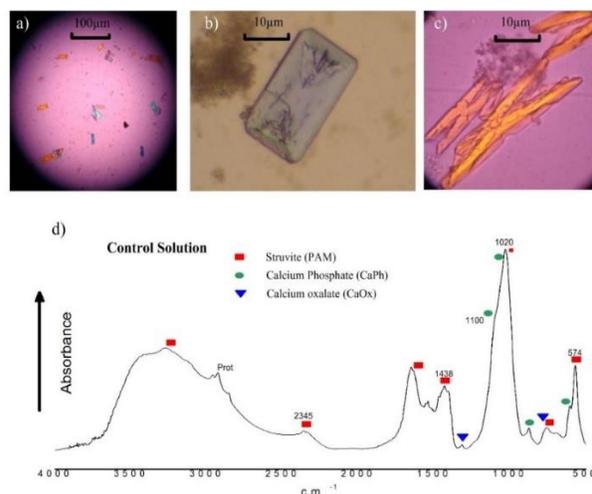
#### Total phenolic and flavonoid contents:

The total phenolic content based FCR reagent ranged between 60.92±0.94mg GAE/g of extract using the calibration curve ( $y = 0.0102x - 0.0307$ ; R<sub>2</sub> = 0.9981). Also, the result obtained for the concentration of The total flavonoid content expressed in mg QE / g of extract ranged between 19.32±0.75 based on the calibration curve ( $y = 0.0066x - 0.0058$ ; R<sub>2</sub> = 0.9985).

#### Litholytic effect of *Fraxinus excelsior* on struvite crystals:

The Figure (Figures. 2b, 2c) represents the formation of struvite crystals induced by biological synthesis (presence of *P. mirabilis*) after incubation at 37°C for 24 h. The results show struvite crystals with various morphologies of coffin-shaped and X-shaped struvite crystals<sup>34</sup>. In addition, it can be seen that the profile of facets is intact, which indicates conditions favorable for germination and crystal growth without serious constraints.

FTIR spectra of urinary pellet samples (resulting from centrifugation) showed that they are formed essentially of struvite, small amounts of calcium phosphate apatites and calcium oxalate, thus confirming the nature of the crystals observed (Fig. 2d).



**Figure 2. Micrographs of struvite crystals induced by *P. mirabilis* after 24 h at 37 ° C. (a-c) in a control solution; (d) FTIR analysis showing PAM nature and their predominance.**

Figure 3 illustrates the litholytic effect of the Aqueous Extract for 60min on struvite crystals that were already induced by *P. mirabilis* after 24 hours at 37 ° C. For low concentrations, Figures 3a-3b show that the struvite

crystals remain intact (at 0.0625 mg/ml), or weakly degrade (at 0.125 mg/ml). Beyond 0.25 mg/ml, the degradation of struvite crystals is all the more accentuated with the increase in the concentration (Figures. 3c, 3e). As regards the high concentrations, the degradation of the struvite crystal structure is accompanied by the appearance of calcium phosphate granules (Figure. 3d, 3e). FTIR spectra of the residue recovered by ultracentrifugation (1 mg/ml of aqueous extract solution; Figure. 3-f) reveals that the amount of struvite has decreased considerably relative to that of calcium oxalate with their crystalline form that predominate; Carapatite (CA) and Amorphous Calcium Phosphate (ACP). FTIR spectra also shows protein absorbance bands related to the presence of bacteria that induce struvite crystal formation.

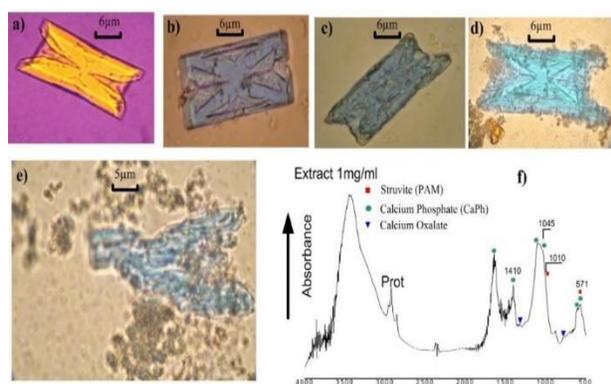


Figure 3. Crystals induced by *P. mirabilis* observed in the presence of the aqueous extract of *F. excelsior* at various concentrations: 0.0625 (a); 0.125 (b); 0.25 (c); 0.5 and 1 mg/ml (e) using PLM and FTIR analysis clearly highlighting the nature of the revealed components

#### Inhibitory effect of struvite crystallization:

##### In the absence of an inhibitor:

In terms of counting the crystals formed in the absence of an inhibitor, a high crystal density (size and number) was recorded (Figure. 4a). These crystals show characteristic struvite facets (Figure. 4A).

##### In the presence of an inhibitor:

For low concentrations of aqueous extract (0.065 to 0.25 mg/ml), the crystal density remains quite high (Figures. 4b, 4c and 4d). This density decreases considerably at high concentrations (0.5 and 1mg/ml) (Figures. 4e, 4f). Morphologically, the crystals obtained appear in lamellae and lamellae aggregates, the edges of which are broken and/or curved (Fig. 4B, C, D, E and F). FTIR analysis revealed that these are struvite crystals (Figure. 5).

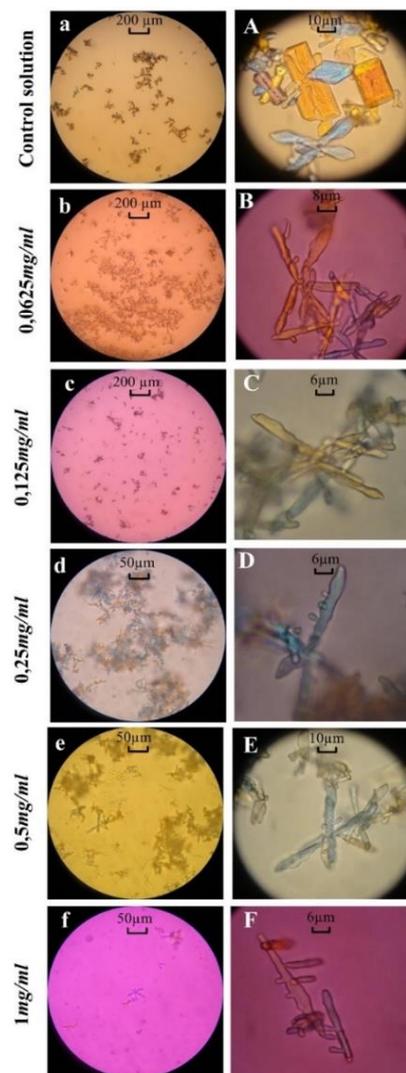


Figure 4: Evaluation of inhibitory action both; in the absence (a, A) and the presence of the aqueous extract of *F. excelsior* at various concentrations: 0.0625 (b, B); 0.125 (c, C); 0.25 (d, D); 0.5 (e, E) and 1mg/ml (f, F) using PLM on chemically synthesized struvite crystals.

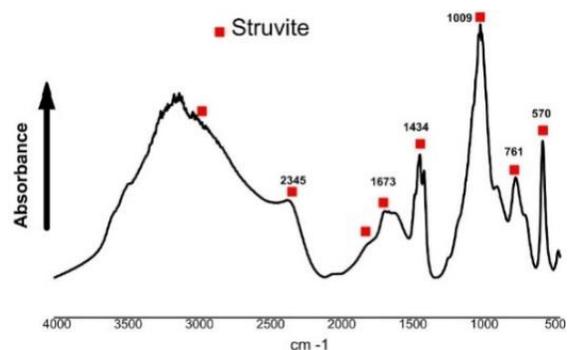


Figure 5: FTIR Spectra of chemically induced crystals in the presence a 0.0625 mg/ml of the aqueous extract of *F. excelsior* concentration after 30 min of incubation at 37 °C.

## DISCUSSION:

Traditionally, several medicinal plants are used to prevent and treat urinary lithiasis<sup>35,36</sup>. It is, however, difficult to determine the exact mechanism attributed to the bioactive constituents<sup>37</sup>. In this regard, several authors have evaluated the *in vitro* effect of different plant extracts on the formation of struvite crystals<sup>38,39,40</sup>. The present study was undertaken to evaluate *in vitro* the litholytic and inhibitory effects of the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* on the struvite crystals. To achieve this, the crystallization of struvite was induced by two processes: biological (in the presence of *P. mirabilis*) and chemical syntheses. As for the biological approach, a 24-hour incubation makes it possible to visualize by polarization microscopy an abundant crystalline population composed mainly of struvite crystals, which appear not only in different facets but also in crystalline aggregates<sup>41</sup>. It's worth note at this level that the crystalline structure of these crystals is intact and that their germination and growth took place without major constraints. The FTIR spectra of the recovered urine residue reveals struvite absorbance bands of calcium phosphate (Carbapatite), calcium oxalate and protein<sup>42</sup>. Besides that, the formation of other components is justified by the presence of calcium chloride dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and sodium oxalate ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) that respectively induces the formation of carbonate apatite and of calcium oxalate in the composition of the synthetic urine. The presence of proteins in the analyzed urinary pellet is directly linked to that of bacteria.

The addition of the aqueous extract after this incubation allowed us to observe with a polarized light a consequent degradation of the crystalline structure of the struvite crystals at concentrations  $\geq 0.5\text{mg/ml}$ . This indicates the significant litholytic effect of the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* on struvite crystals for high concentrations. In this context, the present results are consistent with those obtained by Stefanus et al.,<sup>43</sup> and Chauhan et al.,<sup>44</sup> studies respectively on the leaves of *Orthosiphon aristatus* Bl. Miq and *Boerhavia diffusa* Linn, which indicate that both extracts cause notable defects with defragmentation of struvite crystals at high doses. The fragments thus obtained are easy to be removed via the urinary tract.

The FTIR analysis of the pellets recovered in the presence of the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* shows a predominance of absorbance bands relating to carbonated amorphous phosphate calcium and carbapatite at the expense of those of PAM, which confirms the struvite dissolution.

Struvite is a pH-dependent crystalline species; it forms in alkaline environment ( $\text{pH} > 7$ ) and its treatment involves urinary acidification<sup>45</sup>. After the measurement of pH, it

was found that the formation of struvite crystals is accompanied by urinary alkalization, which results from the urease activity of *P. mirabilis*<sup>46</sup>.

After the addition of AE, and regardless of the independently measured concentrations, the pH remained rather high ( $\text{pH} =$  from 8.9 to 9.1), and therefore is favorable to struvite stabilization, proving that the dissolution observed can be attributed to the action of certain active constituents present in the extract; such as, polyphenols and flavonoids, which are known by their litholytic potential<sup>47</sup>. The chemical synthesis of struvite was characterized by rapid kinetics in which the formation of struvite crystals was observed with both the absence and the presence of the aqueous extract and just after 30 min of incubation. This result had been revealed using PLM and FTIR spectra.

The *in vitro* crystallization of struvite shows that the potential of struvite crystal growth inhibition is proportional to the increasing concentrations of the aqueous extract tested; the more the concentration of the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* increases, the more the average crystal size and number decrease. Sadki and Atmani<sup>31</sup> also reported an *in vitro* growth inhibition study of struvite crystals using the aqueous extract of *E. multiflora*. The results revealed a similar inhibitory effect in which a dose of mg/ml aqueous extract tested induces a reduction in the size and number of crystals (40%) compared to the crystals in the control tube. Further, the study results demonstrated a change in crystal morphology. Therefore, if the inhibition of struvite crystallization can be avoided, infectious lithiasis could also be avoided.

The inhibitory effect of struvite crystallization by the supplementation of the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* was expressed both; morphologically and by the enumeration of the formed struvite crystals. Indeed, for all of the aqueous extract concentrations, the morphology of the observed struvite crystals is quite particular and is characterized by lamellae and lamellae aggregate structure with a set of curved edges and contours. In addition, a fairly small number of these crystals were recorded for of the aqueous extract concentrations 0.5 and 1mg/ml. At low concentration of the aqueous extract, the germination and growth of struvite crystals are in fact governed by a fairly good velocity of kinetics fast enough to outweigh the inhibitory effect of the extract.

The latter exhibits by a noticeable modification of the crystals morphology. At a high concentration, the inhibitory potential of the aqueous extract is relatively significant not only for the crystals morphology but above all for the consequent reduction in their number.

The results of this study are in consistent with those reported by Kaleeswaran et al.,<sup>48</sup> and Reshma et al.,<sup>49</sup> who showed that the aqueous extracts of *Pedalium murex* Linn and *Scoparia Dulcis* exerted, in addition to the litholytic effect, *Fraxinus excelsior* an *in vitro* inhibitory effect on struvite crystallization. Thus, the phenolic compounds present in may be responsible for the inhibitory and/or litholytic activities on the crystallization of struvite<sup>17</sup>.

Several studies related to anti-crystallization compounds of plant origin; such as, polyphenols and flavonoids, have reliable results in treating struvite crystals. Prywer and Torzewska<sup>50</sup> reported the effect of the Polyphenolic Curcumin Compound against *P. mirabilis* during struvite crystallization in an artificial urine. In the presence of curcumin, the results revealed that the induction time increases, and the efficiency of struvite formation decreases, in which it does not affect crystals morphology in relation to the absence of curcumin. Torzewska and Rozalski<sup>17</sup> reported an *in vitro* crystallization inhibition by various phenolic substances on crystal formation induced by *P. mirabilis*. The results show that nearly 50% of the tested substances prevented the formation of struvite crystals and successfully inhibited urease activity, which is the driving force for struvite crystallization. Dayana Jeyaleela G and her collaborators<sup>51</sup> confirmed the inhibitory potential of flavonoids extracted from the leaves of *Meliadubia* on struvite crystals. The results showed that the flavonoids act on urease by inhibiting the latter through hydrogen bonds formation and van der Waals interactions. In addition to its direct effects on urease, the flavonoids inhibited crystallization, distorting the struvite crystal surfaces.

The chemical composition analysis of the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* shows that it contains a significant amount of polyphenols and flavonoids, which insinuates the formation of crystals containing active substance complex; the complexes formed are usually more water soluble than the crystals itself. These *in vitro* assays show that the aqueous extract of *Fraxinus excelsior* is effective in dissolving and inhibiting the crystallization. The prevention against infection lithiasis is primarily based on inhibiting crystal growth and dissolving struvite crystals.

#### CONFLICT OF INTEREST:

The authors have no conflicts of interest regarding this investigation.

#### ACKNOWLEDGEMENTS:

Authors would like to thank the team of Laboratory of Biophysics, Faculty of Medicine, Annaba (Algeria), Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology,

Annaba University (Algeria).

The authors also thank Professor Rym MECHERI (Department of Pharmacy, Faculty of Medicine -Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria) for the plant identification.

#### REFERENCES:

1. Khitri W, Lachgueur N, Tasmaout A, Lardjam A et Khalfa A. Plantes antilithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie: Approche ethnobotanique et phytochimique. *Revue d'ethnoécologie* 2016; 9: 2267–2419. <https://doi.org/10.4000/ethnoecologie.2511>
2. Neeraja Kamakshi U, Ganga Rao B, Venkateswara Rao B. Comparison of *In vitro* Antirolithiatic Activity of Aervalanata, Sphaeranthusindicus, Merremiaemarginata. *Research J. Pharm. and Tech.* 2017; 10(6): 1653-1656. doi: 10.5958/0974-360X.2017.00291.8
3. Amritan Kachru, Monika Bisht, Mamta Baunthiyal. *In vitro* evaluation of anti-neprolithiatic activity of leaves and seeds of *Macrotylomauniflorum* on dissolution or removal of kidney stones. *Res. J. Pharmacognosy& Phytochem.*2016; 8(1): 05-12. doi: 10.5958/0975-4385.2016.00002.9
4. Dileep Singh Baghel, Amit Mittal, Saurabh Singh, Anand Kumar Chaudhary, Amit Bhatia, Shruti Chopra. Formulation, Evaluation and Assessment of *In Vitro* Potential of Gokshur Ghan Tablet against Urolithiasis (Mutrakrichra). *Research Journal of Pharmacy and Technology.* 2021; 14(4):1945-2. doi: 10.52711/0974-360X.2021.00344
5. Tita I, Mogosanu GD, Tita MG. Ethnobotanical inventory of medicinal plants from the South West of Romania. *Farmacia* 2009; 57(2): 141–156.
6. Von Kruedener S, Schneider W, Elstner EF. "A combination of *Populustremula*, *Solidgovirgaurea* and *Fraxinus excelsior* as an anti-inflammatory and antirheumatic drug. A short review". *Arzneimittel-Forschung* 1995; 45(2): 169–171. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7710441/>
7. Middleton P, Stewart F, Al-Qahtani S, Egan P, O'Rourke C, Abdulrahman A, Byres M, Middleton M, Kumarasamy Y, Shoeb M, Nahar L, Delazar A, Deysarker S. Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnusglutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iran. J Pharm Res* 2005; (2): 81–86. <https://dx.doi.org/10.22037/ijpr.2010.620>
8. Flanagan J, Meyer M, Pasamar MA, Ibarra A, Roller M, Genoher NAI, Leiva S, Gomez-García F, Alcaraz M, Martínez-Carrasco A, Vicente V. Safety evaluation and nutritional composition of a *Fraxinus excelsior* seed extract, FraxiPure™. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 53:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.030>
9. Okpanyi SN, Schirpke-von PR, Dickson D. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effect of various plant extracts and their combinations in an animal model. *Arzneimittel-Forschung* 1989; 39(6):698–703. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2476136/>
10. Eddouks M, Maghrani M. Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94(1):149–154. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.005>
11. Eddouks M, Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Michel J-B. *Fraxinus excelsior* L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 99(1):49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.050>
12. Salman A, Muhammad MH, Zafar AM. Antirolithiatic plants: Multidimensional pharmacology. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2016; 5(2): 04–24.
13. R. Kalai, B. Sasirekha. Dietary Guidelines to Reduce the Risk of Renal Stones. *Int. J. Nur. Edu. and Research.* 2018; 6(1): 73-77. doi: 10.5958/2454-2660.2018.00018.2
14. Flannigan R, Choy WH, Chew B, Lange D. Renal struvite stones-pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nat. Rev. Urol.* 2014; 11(6):333–341. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.99>
15. Manzoor MAP, Duwal SR, Mujeeburahiman M, Rekha P-D. Vitamin C inhibits crystallization of struvite from artificial urine in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Braz. J. Urol.* 2018; 44(6):1234-1242. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2017.0656>
16. Chauhan CK, Joshi MJ, Vaidya ADB. Growth inhibition of Struvite crystals in the presence of herbal extract *Commiphora wightii*. *Journal*

- of Materials Science: Materials in Medicine 2009; 20(1): 85. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3489-z>
17. Torzewska A, Rozalski A. Inhibition of crystallization caused by *Proteus mirabilis* during the development of infectious urolithiasis by various phenolic substances. *Microbiological research* 2014; 169(7-8): 579-584. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.020>
  18. Vrunda Zalavadiya, Vipulshah, D.D. Santani. A Review on Urolithiasis and its Treatment using Plants. *Research J. Pharmacognosy and Phytochemistry* 2013; 5(1): 1-8.
  19. Sujoy B, Aparna A. Potential clinical significance of urease enzyme. *European Scientific Journal* 2013; 9(21).
  20. Kappaun K, Piovesan AR, Carlini CR, Ligabue-Braun R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties. *Journal of Advanced Research* 2018; 13:3-17. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>
  21. Rieu P. Lithiases d'infection. *Annales d'urologie* 2005; 39:16-29. <https://doi.org/10.1016/j.anuro.2005.01.001>
  22. Ramadevi S, Kaleeswaran B, Ilavenil S. Effect of traditionally used herb *Pedalium murex* L. and its active compound pedalin on urease expression – For the management of kidney stone. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2020; 27(3):833-839. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.014>
  23. K Geetha, R Manavalan, D Venkappaya. Effects and Causes of Lithiasis. *Research J. Pharmacology and Pharmacodynamics*. 2010; 2(4): 261-267
  24. Daudon M, Jungers, P, Traxer O. Lithiase urinaire. *Lavoisier, Médecine Sciences, Paris*, 2012: 672p.
  25. Falleh H, Ksouli R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdely C. Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt Rend Biol* 2008; 331(5): 372-379. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.02.008>
  26. Spandana. K, Shivani. M, Himabindhu. J, Ramanjaneyulu. K. Evaluation of *In Vitro* Antiurolithiatic Activity of *Vignaradiata*. *Research J. Pharm. and Tech* 2018; 11(12): 5455-5457. doi: 10.5958/0974-360X.2018.00994.0
  27. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977; 28(1): 49-55.
  28. Türkğluet A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry* 2007; 101(1):267-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.025>
  29. Torzewska A, Sączek P, Różalski A. Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharides. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52(6):471-477. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05161-0>
  30. Prywer J, Ewa MB, Marcin O. Struvite crystal growth inhibition by trisodium citrate and the formation of chemical complexes in growth solution. *Journal of Crystal Growth* 2015; 418 :92-101. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2015.02.027>
  31. Sadki C, Atmani F. Évaluation de l'effet antilithiasique, oxalo-calcique et phospho ammoniac-magnésien d'extrait aqueux d'*Erica multiflora* L. *Progrès en urologie* 2017; 27(16) :1058-1067. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2017.09.011>
  32. Daudon M, Protat MF, Réveillaud RJ. Analyse des calculs par spectrophotométrie infrarouge Avantages et limites de la méthode. *Ann Biol Clin* 1978; 36:475-489.
  33. Swapnil R. Lahamage, Avinash B. Darekar, Ravindra B. Saudagar. Pharmaceutical Co-Crystallization. *Asian J. Res. Pharm. Sci.* 6(1): Jan.-Mar., 2016; Page 51-58. doi: 10.5958/2231-5659.2016.00008.4
  34. Li H, Yao Q Z, Wang YY Li Y-L, Zhou G-T. Biomimetic synthesis of struvite with biogenic morphology and implication for pathological biomineralization. *Scientific reports* 2015; 5(1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep07718>
  35. El Habbani R, Lahrichi A, Sqalli Houssaini T, Kachkoul R, Mohim M, Chouhani BA and Chaqroune A. *In vitro* mass reduction of calcium oxalate urinary calculi by some medicinal plants. *African Journal of Urology* 2021; 27:28. <https://doi.org/10.1186/s12301-021-00132-2>
  36. ChandakaMadhu, L. Harish, K. Narsimha Reddy, S. Sagar, D. Soumya, G. Pavan Kumar. Antiurolithic Activity of Aqueous Extract on Roots and Seeds of *Plectranthostomentora* on Ethylene Glycol Induced kidney Stones in Male Albino Rats. *Asian J. Res. Pharm. Sci.* 2(4): Oct.-Dec. 2012; Page 129-133.
  37. N. V. Khokhlenkova, M. V. Buryak, O. V. Povrozina, T. V. Kamina. Principles of the Urolithiasis Phytotherapy. *Research J. Pharm. and Tech* 2019; 12(9):4559-4564. doi: 10.5958/0974-360X.2019.00784.4
  38. Zhu H, Sun X, Lu J, Wang M, Fang Y and Ge W. The effect of plum juice on the prevention of struvite calculus formation *in vitro* BJU Intmationa 2012; 110: E362-E367. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11090.x>
  39. Chauhan CK, Joshi MJ. *In vitro* crystallization, characterization and growth inhibition study of urinary type struvite crystals. *Journal of Crystal Growth* 2013; 362: 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2011.11.008>
  40. Beghalia M, Belouatek A, Ghalem S, and Allali H. Inhibition and Dissolution Crystals of Magnesium Ammonium Phosphate by *Acacia Radiana* (Bark) and (Sheet) *in Vitro* Study Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg 2014; 1: 1523-1531. <http://dx.doi.org/10.15242/IJAAEE.C514072>
  41. Prywer J, Torzewska A. "Bacterially induced struvite growth from synthetic urine: experimental and theoretical characterization of crystal morphology". *Crystal Growth and Design* 2009; 9(8): 3538-3543. <https://doi.org/10.1021/cg900281g>
  42. Jungers P, Daudon M, Le Duc A. Lithiase urinaire. *Flammarion Médecine-Sciences* 1989; 590 p.
  43. Muryanto S, Sutanti S, Kasmiyatun M Inhibition of struvite crystal growth in the presence of herbal extract orthosiphonaristatus BL. MIQ. In MATEC Web of Conferences 2015; Vol. 58, p. 01013. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20165801013>
  44. Chauhan CK, Joshi MJ, Vaidya ADB. Growth Inhibition of Struvite Crystals in the Presence of Herbal Extract *Boerhaavia diffusa* Linn. *American Journal of Infectious Diseases* 2009; 5 (3): 170-179. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2009.170.179>
  45. Scott MD, Andrew JR, Damien MB. Gastric patch pyeloplasty: development of an animal model to produce upper tract urinary acidification for treating struvite urinary calculi. *J. Urol* 2001; 166 (2): 684-687. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)66043-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)66043-0)
  46. Prywer J, Torzewska A. Effect of Curcumin Against *Proteus mirabilis* During Crystallization of Struvite from Artificial Urine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012; Article ID 862794, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2012/862794>
  47. *In vitro* Antiurolithiatic activity of the Leaves and Flowers extracts of *Paronychia argentea*, a plant used in Traditional medicine in Algeria. Omar Mechraoui, Ali Imessaoudene, Mohamed Y. Maiz, Hicham Banouh, Lotfi Mouni, Abdelkrim Rebiai, Mohamed L. Belfar4, Noureddine Elboughdiri, Djamel Ghernaout, Bachir Ben Seghir. *Asian J. Research Chem.* 14(6): November – December 2021 DOI: 10.52711/0974-4150.2021.00069
  48. Kaleeswaran B, Ramadevi S, Murugesan R, Srigopalram S, Suman T, and Balasubramanian T. Evaluation of anti-urolithiatic potential of ethyl acetate extract of *Pedalium murex* L. on struvite crystal (kidney stone). *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2019; 9(1):24-37. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2017.08.003>
  49. Reshma R, Mahima V, Badrinathan S, Himaja M, Sabina EP, ArunaiNambi Raj N. *In vitro* and *In vivo* study on the effect of *Scoparia Dulcis* in inhibiting the growth of urinary crystals. *International Journal of Phytomedicine* 2014; 6: 617-624.
  50. Prywer J, Torzewska A Effect of curcumin against *proteus mirabilis* during crystallization struvite from artificial urine. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med* 2012; 1-7. <https://doi.org/10.1155/2012/862794>
  51. Dayana Jeyaleela G, Rosaline VimalaJ, Senthil R, Anandagopu P and ManjulaK. Isolation, Characterization, Molecular Docking and *in vitro* Studies of Inhibitory Effect on the Growth of Struvite Crystal Derived from *Meliadubia* Leaf Extract. *Asian Journal of Chemistry* 2019; 31(11): 2628-2634. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22217>