

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE : DES SCIENCE
DEPARTEMENT : MICROBIOLOGIE
ET BIOCHIMIE
N°



DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE
ET DE LA VIE
FILIERE : BIOLOGIE
OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par : AOUINA Asma et BOUNOUIGA Asma

Intitulé

Evaluation *in vitro* de l'activité anti-lithiasique
de l'extrait aqueux de la partie aérienne de
Retama retam

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. BELBAHI A.

Président

Dr. BENKHALED A.

Rapporteur

Dr. KHENICHE A.

Examineur

Année universitaire : 2018 / 2019

Remerciements

Tout d'abord nous tenons à remercier DIEU le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail.

En tout premier lieu nous tenons à remercier notre promoteur

Le Dr Benkhaled A pour nous avoir encadrés.

On le remercie

Particulièrement pour son souci de formation, sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses encouragements, ses conseils et suggestions et tout ça dans la bonne humeur.

Nous tenons à remercier M Belbahí A de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance et

M Kheniche A d'avoir gentiment accepté d'examiner et de juger notre mémoire, qu'ils trouvent ici notre sincère gratitude.

Nous tenons à remercier M Kamel Seghíri, et

Toute l'équipe du laboratoire Biochimie

Nous tenons également à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici notre sincère et profonde Gratitude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A tous les personnes qui m'encouragent toujours aux
moments difficiles :*

Mon père : Selimen

*La lumière de ma vie et, merci pour tout ce que vous avez
fait pour moi.*

*A ma mère, **Rebîha***

*Pour sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son
écoute*

*Permanent et son soutien sans égal dans les moments les
plus difficiles de ma vie.*

Mes frères : Hamlawî, Walîd

Mes sœurs: Zainab, Nadjat, Lamis, Nour

Et toute ma famille et sons oublier mes amis et collègues

A toute la promotion de Biochimie appliquée 2018-2019

Asma A

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes que

J'aime :

Mes très chers parents à qui je dois le mérite d'être

Arrivée là, qu'ils trouvent ici l'expression de ma

Profonde gratitude et mon affection.

Mon mari et ma belle fille

Mes très chers frères

A toutes la famille cousins et oncles

A tous mes amis (es)

A ma binôme Asma et toute sa famille

A toute la promotion Biochimie appliquée 2018/2019

Asma B

Résumé

Retama retam (famille de Fabaceae) est largement utilisé dans la phytothérapie traditionnelle, et elle possède plusieurs activités biologiques. Dans ce contexte on a évalué l'activité anti-lithiasique de l'extrait aqueux de *Retama retam*, par la méthode turbidimétrique et microscopique sur la cristallisation oxalocalcique, qui représente le type lithiasique le plus fréquent dans le monde. *R. retam* montre sa richesse en polyphénols totaux (70.60 µg EqAG/mg d'extrait), avec teneurs relativement faible en flavonoïdes (8.44 EQ/mg d'). Les résultats de l'étude de l'activité anti-lithiasique par les deux méthodes a montré que l'extrait aqueux de *R. retam* à un grand effet inhibiteur de la cristallisation oxalocalcique avec un pourcentage d'inhibition de 88.46% pour une concentration de 1mg/ml.

Mots clés : *Retama retam*, activité anti-lithiasique, oxalate de calcium, turbidimétrie.

Abstract

Retama retam (Fabaceae family) is widely used in traditional herbal medicine. And she has several biological activities. In this context, the anti-lithiasic activity of the *Retama retam* aqueous extract was evaluated by the turbidimetric and microscopic method on oxalocalcic crystallization, which is the most common type of lithiasis in the world. *R. retam* shows its richness of the polyphenols (70.60 µg EqAG / mg of extract), with relatively low levels of flavonoids (8.44 EQ / mg of). The results of the study of the anti-lithiasic activity by the two methods showed that the aqueous extract of *R. retam* has a great inhibitory effect of the oxalocalcic crystallization with a percentage of inhibition of 88.46% for a concentration of 1 mg / ml.

Key words: *Retama retam*, anti-lithiasis activity, calcium oxalate, turbidimetry.

ملخص

Retama retam (عائلة Fabaceae) استعملت على نطاق واسع في التداوي بالأعشاب قديما ، والتي لديها العديد من الأنشطة البيولوجية. في هذا السياق، تم تقييم النشاط المضاد لتشكل الحصى الكلوية للمستخلص المائي *R. retam* عن طريق قياس العكورة والطريقة الميكروسكوبية لتبلور أوكسالات الكالسيوم التي تشكل النوع الأكثر إنتشارا في العالم من بين أنواع تشكل الحصى الكلوي. *R. retam* أظهرت ثراءها بالبوليفينولات الكلية (70.60 ميكروغرام مكافئ / ملغ من المستخلص) ، مع مستويات منخفضة نسبياً من الفلافونويد (8.44 مكافئ / ملغ من). أظهرت نتائج دراسة النشاط المضاد لتشكل الحصى الكلوية بكلتا الطريقتين أن المستخلص المائي لـ *R. retam* له قدرة تثبيطية كبيرة على تبلور أوكسالات الكالسيوم مع نسبة تثبيط قدرها 88.46 ٪ لتركيز 1 ملغ. / مل.

الكلمات المفتاحية: *Retama retam*, النشاط المضاد لتشكل الحصى الكلوية, أوكسالات الكالسيوم, العكورة.

Liste des figures

Figure 01 : Distribution géographique de trois espèces de <i>Rétama</i> en Algérie	02
Figure 02 : <i>Retama retam</i>	03
Figure 03 : Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines	10
Figure 04 : Image satellitaire de la localisation de la région de récolte	13
Figure 05 : Protocol d'obtention de l'extrait aqueux	15
Figure 06 : Allure générale de la courbe turbidimétrique sans inhibiteur	17
Figure 07: Histogramme de teneurs en polyphénols et flavonoïdes	21
Figure 08 : cristallisation oxalo-calcique en absence d'inhibiteurs	22
Figure 09 : la cinétique de cristallisation oxalo-calcique en présence de l'extrait aqueux	23
Figure 10: comparaison de pourcentage d'inhibition de la cristallisation oxalocalcique de l'extrait de <i>Retama retam</i> avec celui de l'acide citrique.	23

Liste des tableaux

Tableau 01 : les constituantes de lithiase calcique	06
Tableau 02 : caractéristiques et morphologie de lithiase ammoniacommagnésien	07
Tableau 03 : caractéristiques et morphologie de lithiase urique	07
Tableau 04 : caractéristiques et morphologie de lithiase cystine	08
Tableau05 : Les principaux inhibiteurs avec leurs natures et effets sur la cristallisation	11
Tableau 06 : Evolution des pourcentages d'inhibition et taux des agrégats en absence et en présence d'extrait	25
Tableau 07 : cristallisation d'oxalate de calcium en absence d'inhibiteur et en présence de l'extrait	27

Abréviations

AlCl₃ :	Trichlorure d'aluminium
AV :	Avec inhibiteur
CaCl₂ :	chlorure de calcium
EAG :	équivalent d'acide gallique
EQ :	équivalent de quercitrine
KCl :	chlorure de potassium
MS :	Matière sèche
SI :	sans inhibiteur
PI :	pourcentage d'inhibition
TA :	taux d'agrégation
T :	Temps
UV :	Ultra-Violet

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

Introduction	01
---------------------	-----------

Revue bibliographique

I. <i>Retama retam</i>	
I.1. Le genre <i>Rétama</i>	02
I.2. Distribution géographique	02
I.3. <i>Retama retam</i> Webb	03
I.3.1. Description botanique	03
I.3.2. Systématique de <i>Retama retam</i> (webb)	03
I.3.3. Compositions chimique	04
I.3.4. Utilisations de <i>R. retam</i> Webb	04
II. lithiase urinaire	
II.1. Généralité sur La lithiase urinaire	05
II.2. Définition de lithiase urinaire	05
II.3. Historique	05
II.4. Épidémiologie	05
II.5. Types de lithiase urinaire	06
II.6. Etiologie de lithiase	08
II.7. Les symptômes de la lithiase urinaire	08
II.8. la lithogénèse	08
II.9. Les promoteurs	10
II.10. Les inhibiteurs de la cristallisation	10
II.11. Facteurs favorisant la formation de calcul	11
II.12. Traitement de lithiase	12

Partie expérimentale

Matériels et méthodes	
I. Analyse phytochimique	13
I.1. origine géographique et période de récolte	13
I.2. Préparation de l'échantillon	13
II. Méthodes d'analyses du plant	14
II.1. Taux d'humidité	14
II.2. Préparation de l'extrait aqueux	14
II.3. Dosage des polyphénols totaux	15

II.4. Dosage des flavonoïdes totaux	15
III. Evaluation de pouvoir anti lithiasique	16
III.1. Cristallisation de l'oxalate de calcium	16
III.2. La turbidimétrie	16
III.3. L'allure générale de la courbe turbidimétrique sans inhibiteur	16
III.4. Etude de la cristallisation oxalocalcique par la méthode turbidimétrie avec et sans inhibiteurs	17
III.4.1. Teste en absence d'inhibiteurs (sans extrait)	17
III.4.2. Test avec inhibiteurs	17
IV. Suivie microscopique de la cristallisation de l'oxalate de calcium	18
IV.1. Cristallisation en absence d'inhibiteur	18
IV.2. Cristallisation en présence d'extrait aqueux de <i>Retama retam</i>	18
V. Analyse statistique des résultats	19
Résultats et discussion	
I. Analyse phytochimique	20
I.1. Taux d'humidité	20
I.2. Rendement de l'extraction	20
I.3. Dosage des polyphénols totaux	20
I.4. Dosage des flavonoïdes totaux	20
II. Pouvoir anti lithiasique	21
II.1. Suivie cinétique de la cristallisation oxalocalcique par turbidimétrie	21
II.1.1. Teste en absence d'inhibiteurs	22
II.1.2. Test avec inhibiteurs	22
II.2. Suivie microscopique de cinétique de la cristallisation de l'oxalate de calcium	24
II.2.1. Cristallisation en absence d'inhibiteurs	24
II.2.2. Cristallisation en présence d'extrait	25
Conclusion	28
Annexes	
Références bibliographiques	

Introduction

Introduction.

La plupart des pays industrialisés souffre de lithiase urinaire qui fait partie des pathologies à prévalence élevée. Elle se caractérise par la formation des agglomérations cristallines se développant dans les cavités rénales (**Khitr et al., 2016**). C'est une pathologie dont l'identification nécessite des investigations cliniques et biologiques ; en raison de son caractère récidivant (Bouamoud., 2018).

Le traitement de la lithiase par les médicaments conventionnels a été une solution très dure sur la santé des patients, car ces médicaments peuvent avoir un effet limité, avec des effets secondaire inévitables(Amar, 2010). Ces limites des thérapies du traitement de la lithiase ont poussé des chercheurs à découvrir d'autres thérapies alternatives. L'utilisation des plantes ou de leurs extraits pourrait constituer un excellent moyen de choix (sadki et Atmani., 2017).

L'Algérie possède un patrimoine végétale important regroupant des plantes aromatiques, et médicinales qui sont utilisées dans le traitement des nombreuses pathologies (Amar et al., 2010).

Retama retam est un arbuste caractérisé par une distribution géographique très diversifiée, possédant à la fois des intérêts pharmacologiques et écologiques. En effet *R retam* est une plante connus par ses vertus thérapeutique.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail consiste à évaluer l'activité anti-lithiasique *in vitro* de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Retama retam* vis-à-vis la cristallisation oxalocalcique par les deux méthodes turbidimétrie et microscopie.

Revue
Bibliographique

I. *Retama retam*

I.1. Le genre *Rétama*

Les rétames appartiennent à la famille des Légumineuses ou Fabaceae. Il s'agit de la troisième plus grande famille d'Angiospermes en nombre d'espèces plus de 18 000 classées en 750 genres. Les légumineuses sont représentées dans presque tous les milieux terrestres (excepté en Antarctique). Certaines vivent dans l'eau mais il n'existe pas d'espèces marines (Sandrine, 2004).

Selon Quezel et Santa (1962), les rétames sont des arbustes ou sous-arbrisseaux à fleurs blanches ou jaunes de moins de 15 mm de long. Gousses sphériques ou oblongues ne dépassant pas 15 mm.

En Algérie le genre *Retama* compte trois espèces : *R. sphaerocarpa* (L.) Boiss. *R. retam* Webb, et *R. monosperma* (L.) Boiss.

I.2. Distribution géographique

Les rétames sont distribuées au Nord région de l'Afrique et de la méditerranée orientale et la péninsule du Sinaï (Kassem *et al.*, 2000). En Algérie les rétames (figure 01) colonisent les dunes et lits des oueds, les hauts-plateaux, au Sahara sept atteint au Sud le Tademaït et la hamada de Tinghert (Ozenda, 1991).

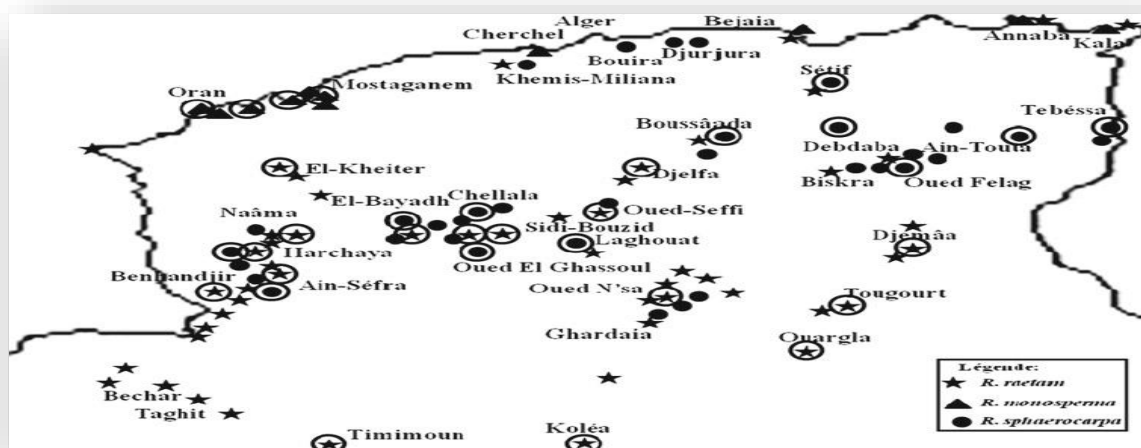


Fig 01 : Distribution géographique de trois espèces de *Rétama* en Algérie (Benmiloud *et al.*, 2011)

I.3. *Retama retam* Webb

I.3.1. Description botanique

Arbuste ou sous-arbrisseaux à fleurs blanches, plus grandes (8-15 mm). Gousse ovoïde aiguë, étendard égalant la carène ou plus long. Feuilles inférieures trifoliolées, les autres simples (figure 02). Arbustes sahariens de 1-3,5 m à rameaux veloutés rapidement aphylls. La floraison de *Retama raetam* est du mois Février à Mars (Quezel et Santa, 1962 ; Ozenda, 1991).

I.3.2. Systématique de *Retama retam* (webb)

Quezel et Santa (1962) ont mentionné l'espèce *R retama* suivre le taxon suivant :

Règne	Plantes (végétal)
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous famille	<i>Papilionaceae</i>
Genre	<i>Retama</i>
Espèce	<i>Retam</i>
Nom vernaculaire	R'tem.



Fig 02 : *Retama retam*

I.3.3. Compositions chimique

Il été rapporté que l'espèce de *retam* contient des alcaloïdes, des flavonoïdes (Hayet *et al.*, 2008). Ainsi des composés phénoliques (Saadaoui *et al.*, 2006). Kassem *et al.*, (2000) ont mentionnés que flavonoïdes tandis que daidzéine, la vicénine-2, la naringénine, l'apignine sont présents dans les graines, la daidzéine 7,4'-diméthyléther, 7-O-glucoside de chrysoérol dans les feuilles. Ils ont aussi isolés deux nouveaux flavonoïdes de la partie aérienne, nommées la lutéoline 4'-O-néohespéridoside et 5,4'-dihydroxy- (3 ", 4"-dihydroxy) -2 ".

I.3.4. Utilisation de *Retama retam* Webb

I.3.4.1. Utilisation pharmacologiques

R retam est utilisée en médecine traditionnelle à cause de ses propriétés thérapeutiques. Il est rapporté que les différentes parties de la plantes sont utilisée par différentes applications.

Dans la région de Djebel Messaad (M'sila), les fleurs sont utilisées en infusion contre les douleurs abdominales, et les tiges en poudre avec l'huile d'olive est très efficace dans le traitement des plaies et des maux de dos (Bounar *et al.*, 2014). Au Liban elle est utilisée contre les douleurs articulaires au Maroc contre les maladies de la peau (Djeddi *et al.*, 2013).

Des études expérimentales récentes sur la plante ont révélé ses différentes propriétés médicinales : antibactérien, antifongique, antihypertenseur, antioxydant, effets néphroprotecteurs (Hayet *et al.*, 2008).

Dans autre étude, a été évaluée l'activité diurétique de l'extrait aqueux des fleurs. L'administration orale de l'extrait à une dose de 20 mg / kg a entraîné une augmentation significative de l'excrétion urinaire de sodium, de potassium et des chlorures chez les rats (Eddouks *et al.*, 2007).

I.3.4.2. Intérêts écologique et économique

R. retam possède un'extrême tolérance à la sécheresse et une acclimatation à l'écosystème du désert (Pnueli *et al.*, 2002). De ce fait, elle permet d'améliorer la fixation et la fertilisation du sol (Benmiloud *et al.*, 2011).

L'espèce *R retam* serve un meilleur fourrage, elle est aussi orientée vers l'industrie. Les fleurs peuvent être utilisées comme conservateur naturel dans les aliments et les produits pharmaceutiques ou industrielles grâce à ces effet antibactérienne (Hayet *et al.*, 2008).

II. Lithiase urinaire

II.1. Généralité sur la lithiase urinaire

La lithiase urinaire, ou formation des calculs dans les voies urinaires, est une pathologie fréquente dans la plupart des pays développés (khitir *et al.*, 2016). Elle a un impact économique et sanitaire négatif sur la population car elle affecte préférentiellement une population active (Sadki et Atmani, 2017). La majorité des calculs relève de mauvaises habitudes alimentaires mais certains sont la conséquence de maladies métaboliques génétiques ou acquises (Cotton *et al.*, 2014).

II.2. Définition de la lithiase urinaire

Le terme lithiase urinaire anciennement appelé « maladie de la pierre » désigne la maladie qui est caractérisée par la formation des calculs dans les reins ou dans les voies excrétrices urinaires (cavités rénales, uretères, vessie). Le mot lithiase vient du grec lithos qui signifie pierre (Daudon *et al.*, 2008).

II.3. Historique

La lithiase urinaire est connue depuis les temps les plus reculés et s'avère indissociable de l'histoire de l'humanité (El Lekhlifi *et al.*, 2014). Sa connaissance remonte à l'haute antiquité. Elliot Smith, il y a environ 5000 ans, en décrivait le premier cas chez un jeune égyptien de 15 ans au décours de 9000 autopsies pratiquées sur des momies. (Benaamar, 2018).

II.4. Épidémiologie

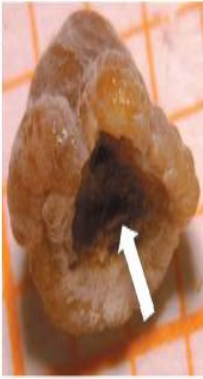
Avec une prévalence d'environ 5 à 10 % dans la tranche d'âge des 20-60 ans, la lithiase urinaire reste une pathologie souvent épisodique. Il s'agit d'une maladie essentiellement masculine (deux à trois hommes pour une femme). L'évolution de cette prévalence au cours du temps est fortement liée à la modification des modes de vie et des habitudes alimentaires : elle a ainsi pu tripler en l'espace de quarante ans. Le risque de récurrence après la découverte d'un premier calcul est de l'ordre de 50 % à 5-10 ans dans la population des 20 à 60 ans (Dalibon, 2015).

II.5. Types de lithiase urinaires

II.5.1. Lithiase calcique

Environ 75 à 80 % de tous les calculs rénaux contiennent du calcium. La plupart sont composés d'oxalate de calcium, seul ou en combinaison avec du phosphate de calcium (Denu-Ciocca *et al.*, 2011). Le tableau donne les différents constituants des lithiases calciques :

Tableau 01 : Les constituantes de lithiase calcique.

Type	Sous type	Dénomination chimique	Nom cristallin	Morphologie	Caractéristiques	Références
Lithiase calcique	Oxalate de calcium	Oxalate de calcium monohydraté	Whewellite		Bruns ou jaune pâle, petits, et bien circonscrits sur les radiographies. Elles peuvent apparaître comme des haltères ou des pyramides	(cotton <i>et al.</i> , 2014 ; denu-ciocca <i>et al.</i> , 2011)
		Oxalate de calcium dihydraté	Weddellite			
	Phosphate de calcium		Carbatite ou brushite		Couleur beige ou blanche	

II.5.2. Lithiase de phosphate ammoniacomagnésien

Elle est d'origine infectieuse (10 à 15 % de tous les calculs) et plus fréquente chez les femmes (Denu-Ciocca *et al.*, 2011). Le tableau 02 montre les caractéristiques et la morphologie de lithiase amoniacomagnésien :

Tableau 02 : Caractéristiques et morphologie de lithiase ammoniacommagnésien (Denu-Ciocca *et al.*, 2011).

Type	Nom cristallin	morphologie	Caractéristiques
Lithiase de phosphate ammoniaco magnésien	Struvite		Brun clair à la radiographie, feuilletée. Ils sont associés à des infections des voies urinaires par des bactéries productrices d'uréase.

II.5.3. Lithiase urique

Les lithiases uriques (tableau 03) représente de 5 à 10 % des lithiases, mais dans les pays méditerranéens, ils interviendraient dans près de 30 % des cas (Denu-Ciocca *et al.*, 2011).

Tableau 03 : Caractéristiques et morphologie de lithiase urique (Denu-Ciocca *et al.*, 2011).

Type	Caractéristiques	morphologie
Lithiase urique	Jaune ou orange, transparents sur les radiographies standard. Elles prennent plusieurs formes, losanges, rosettes, aiguilles.	

II.5.4. Lithiase cystinique

Les lithiases cisténiques (tableau 04) sont moins fréquentes (moins de 2 %) de toutes les lithiases. Elles sont à base de cystéine (Denu-Ciocca *et al.*, 2011).

Tableau 04 : Caractéristiques et morphologie de lithiase cystinique. (Denu-Ciocca *et al.*, 2011).

Type	Caractéristiques	Morphologie
Lithiase cystinique	Jaune-vert et homogènes à la radiographie. Les cristaux de cystine prennent une forme hexagonale ; les lithiases sont souvent bilatérales et peuvent être coralliformes	

II.5.5. Lithiases médicamenteuse

Représentent 1 à 2% des lithiases rénales. Dans certains cas, le médicament ou ses métabolites entrent dans la composition du calcul. Dans les deux cas, la substance lithogène peut provoquer le processus lithiasique ou se fixer sur un calcul déjà présent (Servais *et al.*, 2006).

II.6. Etiologie de lithiase

La lithiase est causée par un excès de substances promotrices (calcium, oxalate, phosphate, urate, sodium, protéines, ammonium, cystine, sodium...) et/ou un déficit de certains inhibiteurs (citrate, pyrophosphate, zinc, magnésium...) dans les urines. Les causes sous-jacentes peuvent être métaboliques, environnementales ou infectieuses et nutritionnelles (Abdelmalek *et al.*, 2001 ; cochat *et al.*, 2012).

II.7. Les symptômes de la lithiase urinaire

Parmi les symptômes de lithiase urinaire est la colique néphrotique qui traduit la distension aigue des cavités rénale par l'accumulation d'urine en amont d'un calcul bloquer dans l'uretère. La lithiase peut aussi entraîner des douleurs abdominales vésicales ou génitales, infection urinaire, insuffisance rénale chronique, hypercalcémie, retard de croissance. Elle est révélée par échographie ou radiographie abdominale. Parfois, la lithiase se manifeste par une hématurie macro ou microscopique (Daudon *et al.*, 2012).

II.8. La lithogénèse

La lithogénèse est l'ensemble des processus qui conduisent au développement d'un calcul dans les voies urinaires. Elle se traduit par une cascade d'événements parfois très espacés dans le temps, parfois au contraire très rapprochés. On peut distinguer deux grandes étapes (Daudon *et al.*, 2008).

II.8.1. la cristallogenèse

Elle comporte plusieurs phases :

II.8.1.1. La sursaturation des urines

Elle est définie par un excès de concentration d'une substance dissoute dans l'urine par rapport aux capacités solvants de celle-ci. Dans des conditions physicochimiques définies (température, pression, pH...) (Daudon *et al.*, 2008).

II.8.1.2. La germination cristalline (nucleation)

Lorsque le niveau de sursaturation est suffisant, les molécules dissoutes se rassemblent pour constituer des germes cristallins, premier stade des particules solides conduisant à la formation de calculs (Daudon *et al.*, 2008).

II.8.1.3. La croissance cristalline

Les cristaux grossissent par captation de nouvelles molécules ou de nouveaux ions de la substance en sursaturation pour former des particules dont la taille varie du micromètre au dixième de millimètre (Dalibon, 2015).

II.8.1.4. Agrégation cristalline

C'est un processus rapide, elle peut de ce fait, engendrer des particules volumineuses dans un délai très court. Les agrégats formés par leur forme irrégulière sont retenus plus facilement dans les voies urinaires (Daudon *et al.*, 2008).

II.8.1.5. Agglomération cristalline

L'agglomération des cristaux implique des macromolécules urinaires protéiques chargées négativement, pouvant se fixer à la surface des cristaux et servant de point d'ancrage à de nouveaux cristaux. (Dalibon, 2015).

II.8.2. Calculgenèse

Elle comporte elle-même plusieurs phases :

II.8.2.1. La rétention des particules cristallines

Des particules cristallines formées au cours des différentes phases de la cristallogenèse vont être retenues dans le rein ou les voies urinaires et vont croître pour former un calcul (Daudon *et al.*, 2008).

II.8.2.2. La croissance de calcul

Lorsque la sursaturation est liée à une anomalie métabolique de forte amplitude, le calcul qui en résulte est généralement pur. Dans le cas contraire, il peut fixer des composants divers au gré des sursaturations urinaires, ce qui explique le fait que la plupart des calculs urinaires renferment plusieurs espèces cristallines (Daudon *et al.*, 2008).

II.9. Les promoteurs

Les promoteurs sont des ions qui participent à la formation des espèces insolubles. Ils s'associent très souvent par deux ou par trois pour former une substance cristallisable qui, elle-même, peut se présenter sous plusieurs espèces cristallines (figure 03) (Daudon *et al.*, 2008).

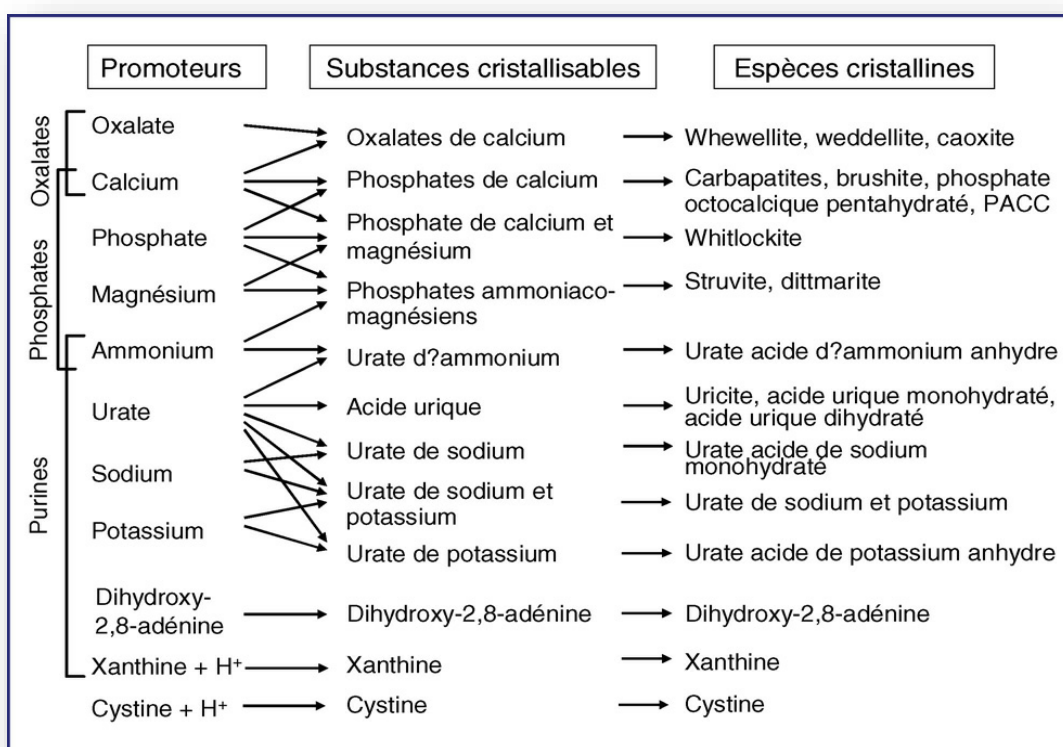


Fig 03 : Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines (Daudon *et al.*, 2008).

II.10. Les inhibiteurs de la cristallisation

La formation des calculs est liée à un déséquilibre entre les substances promotrices et les substances inhibitrices qui sont capables de ralentir la cristallisation des solutés en état de sursaturation (Abdelmalek, 2001 ; Djemoui, 2003).

Les inhibiteurs sont classés selon leurs natures ou poids moléculaire et selon leurs effets sur les phases de cristallisation :

Tableau 05 : Les principaux inhibiteurs la cristallisation (Gupta *et al.*, 2011).

Nature	Inhibiteurs	effets sur la cristallisation
Inorganique (micromoléculaire)	Citrate	Agissent sur la phase de croissance en formant des complexes soluble avec les substances cristallisables et diminuant ainsi la sursaturation.
	magnésium	
	pyrophosphate	Agit sur la croissance et l'agrégation
Organique (macromoléculaire)	Osteopontine	Agissent sur la nucléation, la croissance, et agrégation et, ils exercent leur action directement sur les cristaux en bloquant les sites de croissances situées à leur surface.
	Tamm-Horsfall (THP)	
	Glycosaminoglycans	
	Lithostathine	
	Nephrocalcine	

II.11. Facteurs favorisant la formation de calcul

Plusieurs facteurs de risque lithogènes ont été identifiés (Dalibon, 2015).

- antécédents familiaux dans 40 % des cas ;
- apports alimentaires accrus en produits laitiers, protéines animales, sel, aliments riches en oxalate, purines (favorise l'hyper calciurie) ou sucres rapides (fructose notamment) ;
- consommation faible en fibres alimentaires ;
- La teneur de calcium dans l'eau de boisson est élevée ;
- infection urinaire ;
- anomalies du pH urinaire (normal à 5,8), acide (calculs d'acide urique, de cystine et d'oxalate de calcium) ou encore alcalin (calculs de phosphate de calcium) ;
- anomalies anatomiques favorisant la stase urinaire, donc la formation des calculs
- Iatrogénie médicamenteuse dans 1 % des cas (sulfamides, vitamine C...);

D'autres sont identifiés telle que le voyage prolongé récent, l'activité sportive, le séjour en pays chaud, le travail en ambiance surchauffée et la modification du régime alimentaire (Dalibon, 2015).

II.12. Traitement de lithiase**II.12.1. Traitement pharmacologique**

La prise en charge, multidisciplinaire est faite essentiellement par des médicaments spécifiques selon le type de lithiase (Dalibon, 2015). Ce traitement a pour but de diminuer la fréquence des récives et de réduire la morbidité due aux calculs (Benhlma, 2017).

II.12.2. Traitement chirurgical

Le traitement chirurgical vise à éradiquer tout calcul dans l'arbre urinaire. L'urologue prend en compte la localisation du calcul, sa taille, sa composition, l'anatomie des voies urinaires et la morphologie du patient (Dalibon, 2015).

II.12.3. Traitement préventif

Le patient doit adopter un régime alimentaire équilibré, normalisé en calcium (800 mg à 1 g/jour), en sel (< 9 g/jour) et en protéines animales (< 1,2 g/kg/jour). Les aliments riches en fibres naturelles contiennent de l'acide phytique ayant la capacité à se lier au calcium pour former des complexes inabsorbables (Dalibon, 2015). De plus la base du traitement de toute lithiase est la dilution des solutés contenus dans l'urine grâce à l'augmentation de la diurèse, et donc de l'hydratation (cochat *et al.*, 2012).

Partie
Expérimentale

Matériels
Et
Méthodes

I. Analyse phytochimique

I.1. Origine géographique et période de récolte de la plante

La plante utilisée dans ce travail est *R. retam*, la cueillette d'échantillon a été faite au mois de Février 2019 après la période de floraison dans la région de Bir Arbi situé à 77 Km sud-est du chef-lieu de wilaya de M'sila (figure 04).



Fig 04 : Image satellitaire de la localisation du région de récolte (Google Maps).

I.2. Préparation de l'échantillon

Séchage et broyage

La plante fraîchement récoltée, a été lavée afin de la débarrasser de poussière et d'autres particules. La partie aérienne est séchée dans l'étuve à 60°C jusqu'à la stabilisation du poids. Le matériel végétal récolté est ensuite broyé à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène permettant d'améliorer le rendement d'extractions. Cette poudre est conservée dans des flacons fermés étiquetés, en vue de procéder aux différentes manipulations.

II. Méthodes d'analyse de la plante

II.1. Taux d'humidité (teneur en eau)

La détermination de la matière sèche a été réalisée selon la méthode proposée par Benkhaled (2018) avec quelques modifications. Juste à l'arrivée des échantillons au laboratoire, la dessiccation est réalisée par évaporation de 1g de matière végétale 1g de matière végétale e, jusqu' à ce que le poids devienne pratiquement constant. La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subi lors de la dessiccation. Ce teste est réalisé en triplicata.

La détermination de teneur en eau se fait par le calcul de la différence de poids avant et après la dessiccation selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = [(M1 - M2) / M1] \times 100$$

M1 : masse en g de l'échantillon avant séchage.

M2 : masse en g de l'échantillon après séchage.

II.2. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux est obtenu par infusion de 40 g de poudre sèche dans 400mL de l'eau distillée bouillante pendant 2 heures sous agitation continue. L'infusé est laissé refroidir à température ambiante, l'extrait bruts est obtenu après filtration par tissus puis filtration sous vide avec du papier Wattman N°3. Le filtrat récupéré est placé dans des boites de pétries puis séché à sec dans l'étuve à 60° C. L'extrait sec obtenu est gratté par la suite conservé à l'abri de la lumière à 4°C dans des flacons en verre hermétiquement fermé pour une utilisation ultérieure (Benkhaled et Sinator, 2015) (Figure 05).

Rendement en extraits bruts secs

Le rendement est exprimé en pourcentage de la matière sèche (% ms) calculé selon l'équation suivante :

$$R\% = (m/M) * 100$$

R% : rendement exprimé en % ms

m : masse de l'extrait sec

M : masse de la poudre végétale

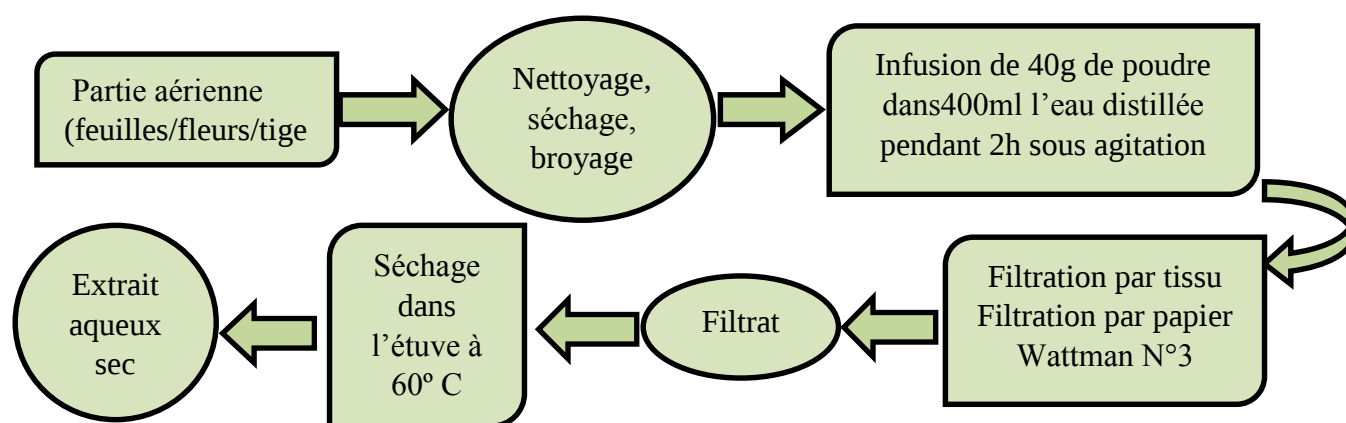


Fig 05 : Protocol d'obtention de l'extrait aqueux

II.3. Dosage des polyphénols totaux

La teneur phénolique totale est généralement déterminée colorimétriquement par un spectrophotomètre selon la méthode de Folin-Ciocalteu.

Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin-ciocalteau par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces dernières présentent un maximum d'absorption à 765nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans l'échantillon (Georgé, 2005).

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé selon le protocole décrit par Boizot et charpentier (2006).

Pour cela 200 µl d'extrait sont ajoutés à 1000 µl de réactif de Folin-ciocalteau (10%), après 4 minutes 800 µl de la solution aqueuse de bicarbonate de sodium (10%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm. Parallèlement une gamme d'étalonnage est établie avec l'acide gallique (0-100 µg/ml) et les résultats sont exprimés en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

II.4. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon méthode de trichlorure d'aluminium décrite par Bahorun (1997). Les flavonoïdes donnent avec le chlorure d'aluminium des complexes de couleur jaune, dont l'intensité de la couleur est mesurable à 430 nm.

A 1ml d'extrait, est ajouté 1ml de solution de AlCl_3 (2%) dans le méthanol, après 10 minutes d'incubation ; l'absorbance est mesurée à 430 nm. La concentration en flavonoïdes est déterminée à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2.5 - 20 $\mu\text{g/ml}$). Les résultats sont exprimés en μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg Ex}$). Tous les essais sont réalisés en triplicata.

III. Evaluation du pouvoir anti-lithiasique

Dans notre travail, on s'est intéressé à évaluer le pouvoir inhibiteur de l'extrait aqueux de partie aérienne de *R. retam* sur la cristallisation oxalocalcique *in vitro*, on reposant sur le principe de turbidimétrie, suivi par étude microscopiques.

III.1. Cristallisation de l'oxalate de calcium

L'oxalate de calcium (CaC_2O_4) est un cristal ionique insoluble dans l'eau. Il est le principal composant des calculs urinaires. La cristallisation ou la formation des calculs d'oxalate de calcium se fait par précipitation selon l'équation suivante :



III.2. La turbidimétrie

La turbidimétrie est une méthode optique qui mesure l'absorbance de la solution, et assure le suivi de la cinétique de cristallisation d'une façon continue (Abdelmalek *et al.*, 2001).

III.3. L'allure générale de la courbe turbidimétrique sans inhibiteur

La courbe peut être divisée en trois parties (figure 06).

La première partie : correspond à l'étape de nucléation (germination).

La 2^{ème} partie : correspond à l'étape de croissance cristalline (caractérisée par la pente turbidimétrique)

La 3^{ème} partie : correspond à l'étape d'agrégation cristalline.

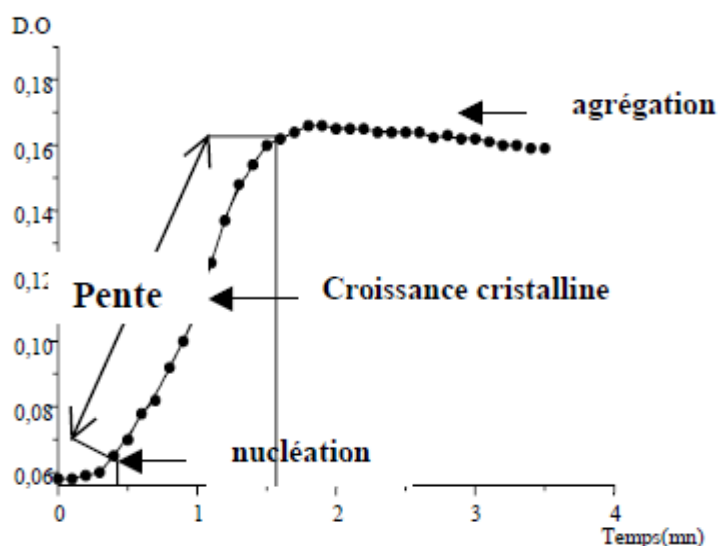


Fig 06 : Allure générale de la courbe turbidimétrique sans inhibiteur (Abdelmalek *et al.*, 2001).

III.4. Etude de la cristallisation oxalocalcique par méthode turbidimétrique avec et sans inhibiteurs

La cristallisation oxalocalcique a été induit à la mélange de deux solutions ; une solution de CaCl_2 (20mM), et de l'oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (2mM). Les dilutions ont été préparées avec une solution de NaCl (0.15 M).

III.4.1. Test en absence d'inhibiteurs (sans extrait)

Un volume de 1.5ml de CaCl_2 est placé dans un cuve, placé dans un spectrophotomètre et tarer au zéro, aussi tôt 1.5ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ est versé rapidement sur la solution de CaCl_2 . La mesure de l'absorbance est déclenche immédiatement chaque 6s pendant 20 min (Abdelmalek *et al.*, 2001).

III.4.2. Test avec inhibiteurs

L'évolution de la cristallisation oxalocalcique en présence de l'extrait aqueux de *R retam* est la même que celle utilisée en absence d'inhibiteur.

On ajoute 1ml de la solution inhibitrice de différentes concentrations (100%, 50%, 5%, 0.5%) à 1ml de CaCl_2 (20mM). Tarer le spectrophotomètre au zéro aussitôt 1ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (2mM) est versé rapidement. La mesure de l'absorbance est déclenche immédiatement chaque 6s pendant 20 min (Abdelmalek *et al.*, 2001). La manipulation se fait contre un inhibiteur de référence, l'acide citrique avec les concentrations (100%).

Le pourcentage d'inhibition

Les pourcentages d'inhibition déterminés à partir des pentes turbidimétriques en présence et en absence d'inhibiteur sont calculés par la formule suivante :

$$PI \% = [1 - (P_{SI} / P_{AI})] \times 100$$

P_{SI} : pente turbidimétrique en absence d'inhibiteur.

P_{AI} : pente turbidimétrique en présence d'inhibiteur.

IV. Suivi microscopique de la cristallisation de l'oxalate de calcium

Le développement et l'agrégation des cristaux de l'oxalate de calcium sont effectués par la préparation de l'urine synthétique à partir des solutions aqueuses de, KCl (0.2 M), CaCl₂ (0.1M) et d'oxalate de sodium (0.1 M). La procédure de préparation est comme suite :

Dans un erlenmeyer de 100 ml sont introduits : 75 ml de solution de KCl, 15 ml de tampon phosphate (pH=6.0) et 1.5 ml de solution aqueux de CaCl₂. La solution est portée sous agitation magnétique (150 tpm), ensuite 5 ml de l'eau distillée sont ajoutées pour l'étude sans inhibiteur. Un 1.5 ml de solution d'oxalate de sodium est introduit. Le volume de solution est ajusté à 100 ml avec la solution de KCl

IV.1. Cristallisation en absence d'inhibiteurs

L'urine synthétique est maintenue sous agitation magnétique (150 tpm) à 37°C. Après l'agitation, on pose une goutte de la suspension entre cellule Thoma et lamelle à l'aide d'une pipette pasteur et grâce au microscope optique (l'objectif X40) on détermine le nombre des cristaux et d'agrégats d'oxalate de calcium di-hydraté. La cinétique est suivie 5 min pendant 55 minutes (Sbahi, 2017).

IV.2. Cristallisation en présence d'extrait aqueux de *Retama retam*

Nous avons Observés le développement des cristaux d'oxalate de calcium dans la solution aqueuse en présence de l'extrait de RR avec les concentrations (100%, 50%, 5%,0.5%). Le volume d'eau distillée (5ml) est remplacé par 05 ml de l'extrait aqueux. De la même façon précédente on suivit la cinétique de cristallisation pendant 55 minutes (Sbahi, 2017).

Pourcentage d'inhibition (I %)

Le pourcentage d'inhibition (%) est calculé pour évaluer le développement du nombre de cristaux. Il se calcule comme suit :

$$\text{PI}\% = 1 - (\text{AI} / \text{SI}) \times 100$$

AI : le nombre des cristaux et des agrégats avec inhibiteur.

SI : le nombre des cristaux et des agrégats sans inhibiteur.

Le taux d'agrégation

Ce taux d'agrégats représente le pourcentage d'agrégats par rapport au nombre total de cristaux et qui est déterminée par la formule suivante :

$$\text{TA} = (\text{Nombre d'agrégats} \times 100) / (\text{Nombre de cristaux isolés} + \text{Nombre d'agrégats}).$$

V. Analyse statistique des résultats

Les données obtenues ont été analysées à l'aide du programme Graphpad prism version 7. La différence statistique entre les résultats a été réalisée grâce à l'analyse des variances (Anova One way), suivie du test de comparaison multiple de Dunette, avec un seuil significatifs $p < 0.05$.

Résultats
Et
Discussion

I.1. Analyses phytochimique

I.1. Taux d'humidité

Le séchage juste après la récolte permet de mesurer la teneur en eau de la partie aérienne de *R. retam*. Le taux d'humidité estimé est de 45.7 %, cette valeur est relativement élevée par rapport à la région de récolte qui est caractérisée par un climat aride dans lequel la salinité est très élevée. Cela montre la tolérance de *R. retam* à la sécheresse grâce à une combinaison de mécanismes biochimiques, moléculaires et structurels adaptatifs (Pneuli *et al.*, 2002).

I.2. Rendement de l'extraction

L'extraction aqueuse de la partie aérienne de *R. retam* par infusion nous donne un rendement de 21.4%. Cette méthode permet l'extraction des substances solubles dans l'eau (composés polaires) en quantité importante.

Ce procédé d'extraction est utilisé également d'extraire le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification.

I.3. Dosage des polyphénols totaux

L'analyse quantitative des polyphénols totaux de l'extrait aqueux de *R. retam*, a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard. La quantité des polyphénols a été rapportée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg Ex}$).

Le résultat du dosage des polyphénols montrent que l'extrait aqueux de la partie aérienne représente une teneur de 70.60 $\mu\text{g EAG}/\text{mg Ex}$. (figure08).

D'après Hayet *et al.*, (2008), les résultats du dosage des polyphénols de l'extrait méthanolique préparé à partir des fleurs de *R. retam* été de: 179.39mg EAC/g. Ce taux est très élevé comparé avec notre résultat. En effet les feuilles de *R. retam* de même région en Tunisie, mais récoltées à différentes périodes ont présenté des teneurs similaires en polyphénols (5,96 mg (EAG)/g de MS, 6,32 mg (EAG)/g de MS) (Saadaoui *et al.*, 2006). Ces variations pourraient être dues à l'origine de la plante (facteurs climatiques telle que la température, la précipitation, la durées d'ensoleillement), à l'organe végétal utilisé, et au solvant d'extraction (Saadaoui *et al.*, 2006 ; Khouchlaa *et al.*, 2017).

I.4. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait aqueux de *R. retam* dosé selon la méthode de trichlorure d'aluminium est exprimée en milligramme équivalent de quercétine.

Notre extrait révèle une teneur faible de flavonoïdes de 8.44 EQ/mg.(figure 08). Hayet et al (2008) en travaillant sur les fleurs de *R retam* de Tunisie, ont trouvé que la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles est très élevée par rapport à la nôtre (extrait méthanolique présent un taux de 41.58 (mg CAE/g). Cette différence s'expliquerait aussi par la différence du solvant extracteur de l'organe utilisée de la plante.

La figure 07 montre la richesse de *R retam* en polyphénols et sa faible teneur en flavonoïdes. Cette richesse peut être corrélée à divers effets pharmacologiques de cette plant.

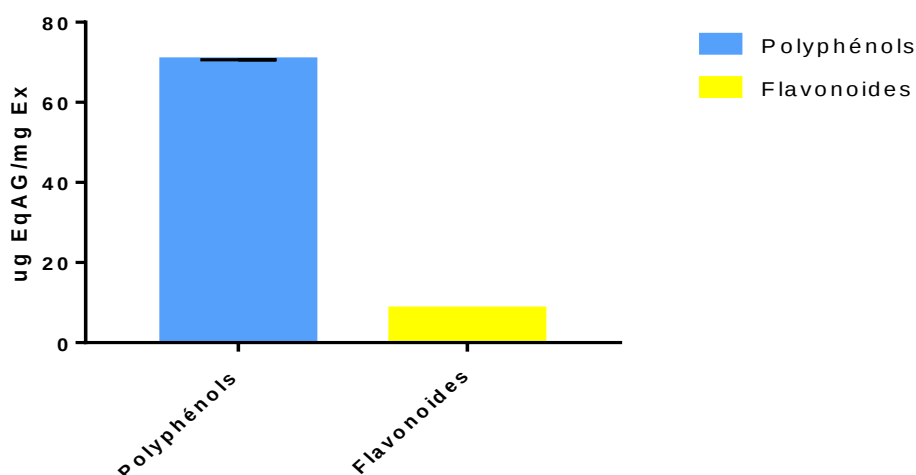


Fig 07 : Histogramme de teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

II. Pouvoir anti-lithiasique

Plusieurs études expérimentales *in vitro* ont démontré l'effet des plantes médicinales sur la lithiase urinaire (Khouchlaa *et al.*, 2017). La plante *R retam* est citée dans plusieurs études en Algérie et Tunisie mais aucune étude visant à confirmer ses propriétés anti lithiasiques. Pour cela on a testé l'effet de son extrait aqueux sur la cristallisation oxalo-calcique.

II.1. Suivre cinétique de la cristallisation oxalo-calcique par turbidimétrie

Le suivre de cinétique de la cristallisation oxalocalcique permet d'évaluée l'activité inhibitrice de l'extrait aqueux de *R retam*. Plusieurs tests ont été réalisés afin de déterminer les paramètres caractérisant l'évaluation de la cristallisation à savoir : la pente turbidimétrique et le coefficient de régression linéaire (R^2).

II.1.1. Test en absence d'inhibiteurs

Les résultats obtenus du test sans inhibiteurs sont présentées dans la figure 08.

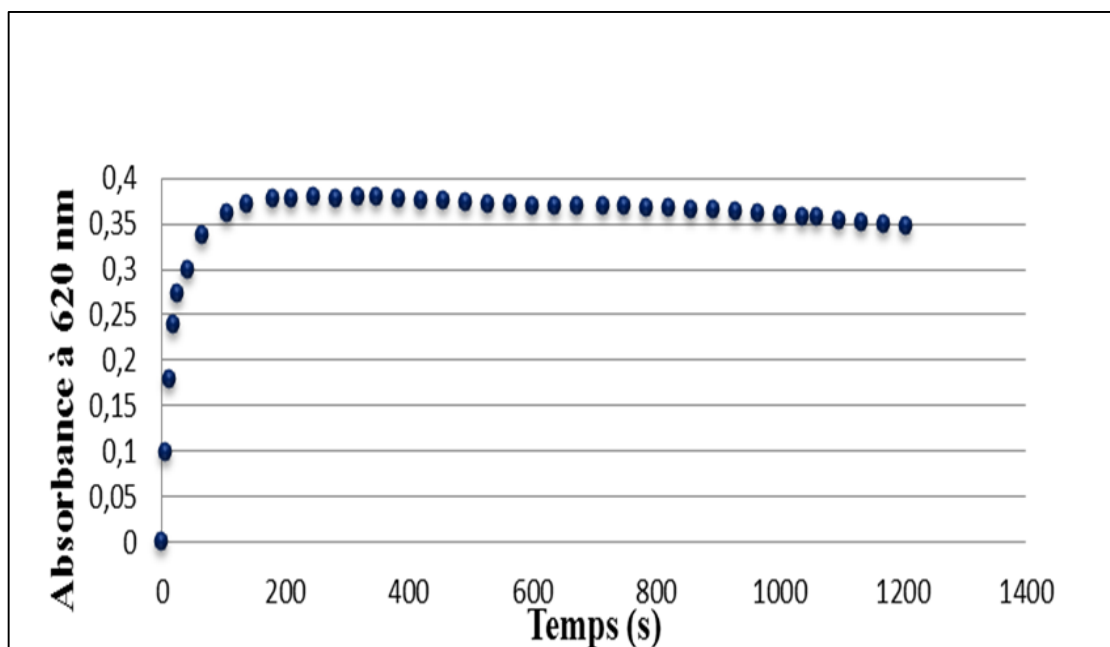


Fig 08 : Cristallisation oxalo-calcique en absence d'inhibiteurs.

La figure 08 représente une courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps. L'allure générale de la courbe turbidimétrique sans inhibiteur est divisée en trois phases : nucléation, croissance et agrégation (Abdelmalek *et al.*, 2001). Par contre, notre courbe possède seulement deux phases : la croissance et l'agrégation. La phase de nucléation cristalline n'apparaît pas, puisque cette étape est caractérisée par un temps de latence durant lequel l'absorbance est pratiquement nulle. D'autre part les facteurs physiques telle que pH, température et l'agitation sont incontrôlés et qui peuvent influencer cette phase (figure 09).

II.1.2. Test avec inhibiteurs

Nous avons testé l'effet de l'inhibition de l'extrait aqueux de *R retam* à différentes concentrations (100% (1mg/ml), 50%, 5%, 0.5%) sur la cristallisation oxalocalcique par rapport à un inhibiteur de référence l'acide citrique 1mg/ml (100%). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 09.

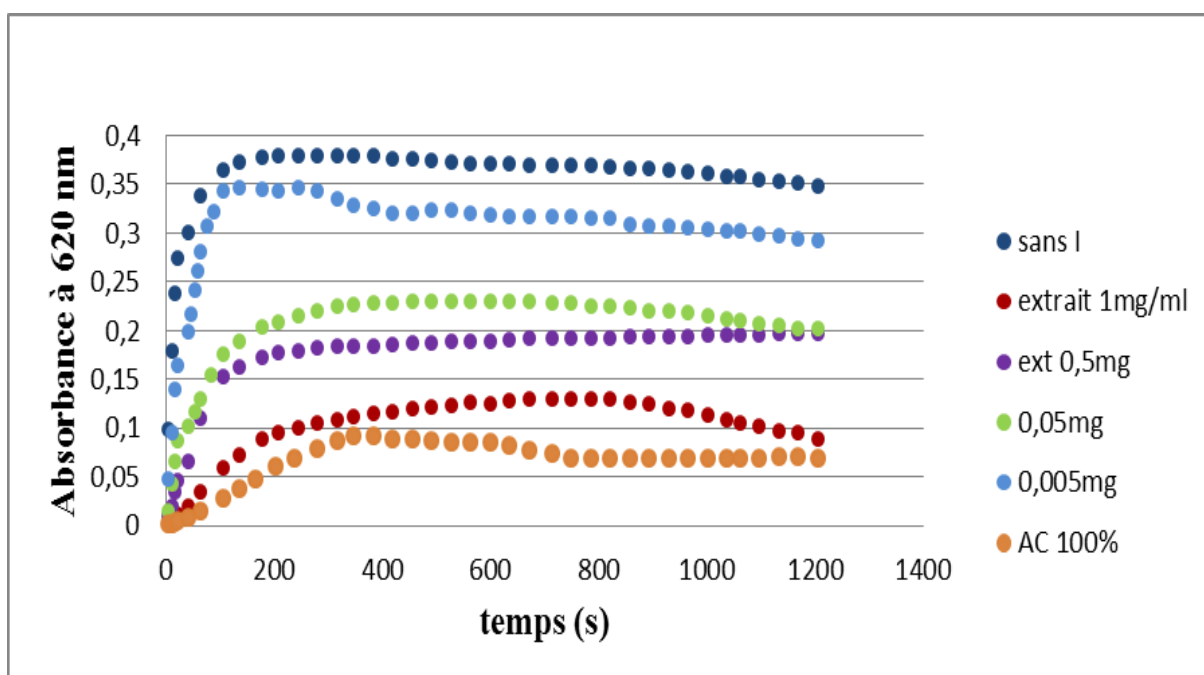


Fig 09 : Cinétique de cristallisation oxalo-calcique en présence de l'acide citrique et d'extrait aqueux

La figure 09 représente la variation de l'absorbance en fonction de temps et montre que les courbes cinétiques de l'extrait à différentes concentrations sont au-dessous de la courbe de cristallisation en absence d'inhibiteur. Ces courbes sont caractérisées par des pentes turbidimétriques qui varient inversement des concentrations en extrait.

Les résultats d'analyse statistique (test Dunette $p < 0.05$) des pourcentages d'inhibitions sont présentés dans la figure10.

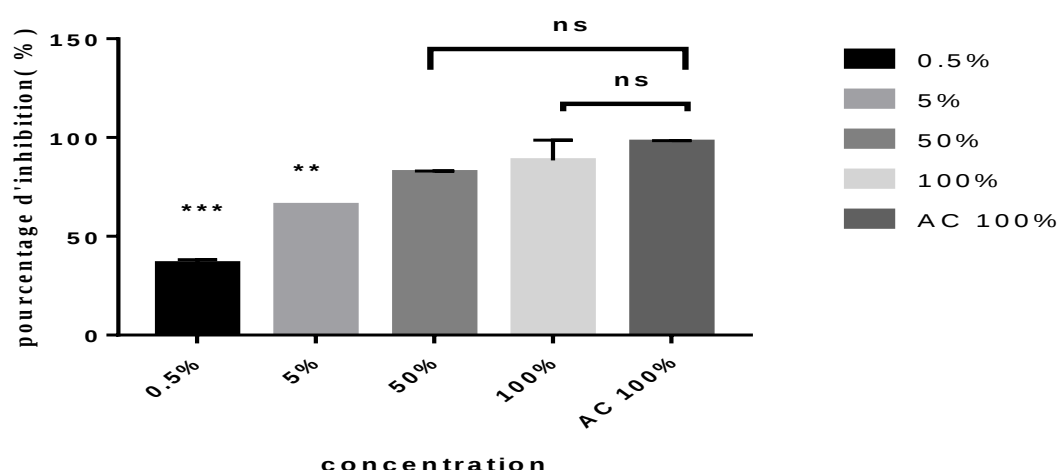


Fig 10 : comparaison des pourcentages d'inhibition de la cristallisation oxalocalcique de l'extrait avec celui de l'acide citrique, ns (effet non significative ($p > 0.05$) test Dunnett), (**) significatifs (***) très significatifs.

Les résultats statistiques montrent une différence non significative ($P > 0.05$), de l'extrait aqueux aux concentrations 50%, 100%, par rapport à l'acide citrique (100%). Les activités inhibitrices de la cristallisation sont respectivement 82.48%, 88.46% et 97.86%.

Par contre, les pourcentages d'inhibition de l'extrait aqueux à concentration 5% et 0.5% ont une différence significative ($p < 0.05$) et très significative ($p < 0.01$) respectivement par rapport à l'acide citrique. Ce pourcentage d'inhibition étant 65% et 36%.

En analysant ces résultats, on déduit que l'activité anti-lithiasique est dépendante de la concentration de l'extrait, plus la concentration est élevée plus le pourcentage d'inhibition augmente. Ce dernier est inversement proportionnel à la pente de la courbe turbidimétrique.

De nombreux travaux se sont intéressés à l'activité des extraits de plantes médicinales sur lithogénèse. Diverses plantes ont été rapportées pour inhiber la cristallisation d'oxalate de calcium par l'application des différents protocoles *in vivo* et *in vitro*. Selon Kachkoul et al (2017), le pouvoir inhibiteur de la cristallisation de l'oxalate de calcium *in vitro* par modèle turbidimétrique des extraits méthanoliques de *Punica granatum* et d'*Ammi visnaga* sont respectivement 97.8%, 73.25%. L'activité antilithiasique de l'extrait aqueux d'*Hordeum vulgare*, par la même méthode donne un très faible pourcentage d'inhibition 6.2% pour une concentration de 1mg/ml d'extrait (Djaroud et al., 2012). En outre, l'extrait aqueux de *Cynodon dactylon* montre effet anti-lithiasique avec un taux d'inhibition de 60% à la concentration 1mg/ml (Sekkoum et al., 2010).

Ces comparaisons montrent que notre extrait exhibe un grand pouvoir inhibiteur vis-à-vis la cristallisation oxalocalcique.

II.2. Suivi microscopique de cinétique de la cristallisation de l'oxalate de calcium

Afin de valider les résultats obtenus par le modèle turbidimétrique, et de déterminer à quelle étape de cristallisation (nucléation, croissance, aggrégation) il agit notre extrait, nous avons suivi la cinétique de formation des cristaux et des agrégats d'oxalate de calcium par microscope optique en absence et en présence de l'extrait aqueux. Le taux d'inhibition est calculé à partir du nombre moyen des cristaux et des agrégats.

II.2.1. Cristallisation en absence d'inhibiteurs

En absence d'inhibiteur, la cristallisation est caractérisée par la formation d'un grand nombre de cristaux à partir de la 10^{ème} minute, le nombre augmente jusqu'à 55^{ème} minute.

Au-delà de la 55^{ème} minute le nombre des cristaux diminue (tableau 07) ce qui entraîne la condensation de ces derniers pour former des agrégats (taux maximale de 82.36).

II.2.2. Cristallisation en présence d'extrait

L'étude microscopique de la cristallisation oxalocalcique en présence de l'extrait aqueux de *R retam*, à différents concentrations montre une diminution remarquable du nombre des cristaux et des agrégats oxalocalcique, avec ceux formés en absence de l'extrait. (tableaux 06 et 07).

Tableau 06 : Evolution des pourcentages d'inhibition et des taux d'agrégats en absence et en présence d'extrait

		Temps (min)				
		10	20	25	40	55
SI	C+A	6390	6340	4310	3650	3460
	TA	5,39	15,33	19,16	45,20	82.36
0.5%	PI%	0	32.33	33.64	32.05	17.34
	TA	4.52	14.98	18.32	41.90	79.29
5%	PI%	23.72	44.91	56.1	31.37	23.36
	TA	4.78	14.07	15.95	38.83	76.13
50%	PI%	35.52	62.77	50.81	56.16	26.30
	TA	2.54	7.45	10.37	26.25	52.94
100%	PI%	40.53	47.00	76.79	64.39	49.42
	TA	0.00	3.27	8.52	19.50	20.80

L'extrait à la concentration de 1mg/ml engendre une diminution du nombre des cristaux à partir de la 10^{ème} (40.53%) minute, cette inhibition atteint une valeur maximale à la 25^{ème} minute (76.79%) ce qui à retarder l'apparition des agrégats. Ce temps correspond à la phase de croissance. A partir de 25^{ème} minute ce pourcentage diminue progressivement pour atteindre une valeur minimale (49.42%) à la 55^{ème} minute.

L'extrait aux concentrations 50%, 5% et 0.5% présentent respectivement des pourcentages d'inhibition maximale 62.77%, 56.80% et 33.64% entre l'intervalle 20 et 25^{ème} minutes.

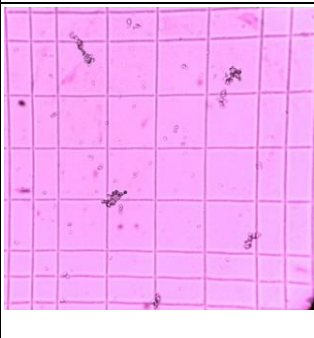
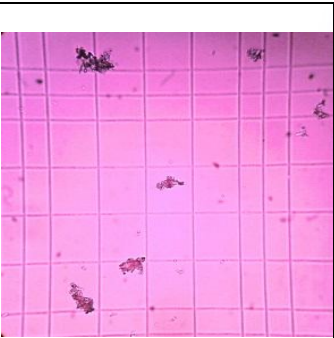
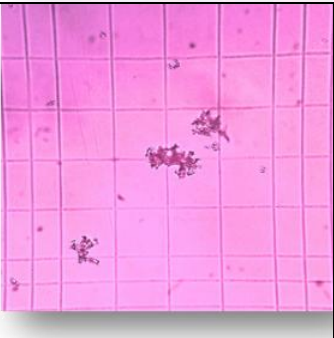
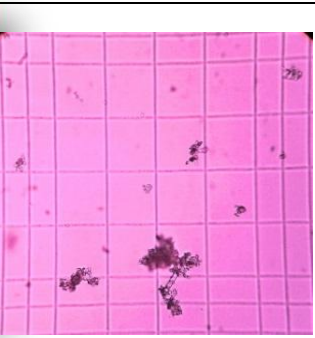
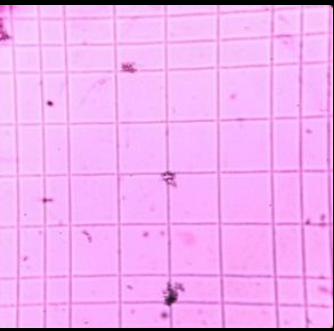
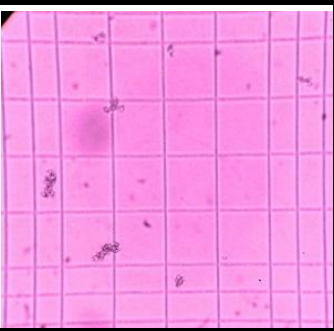
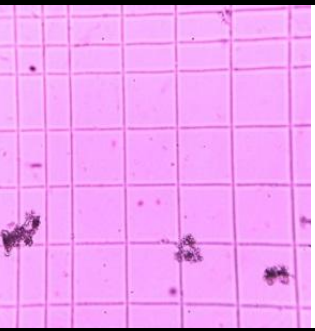
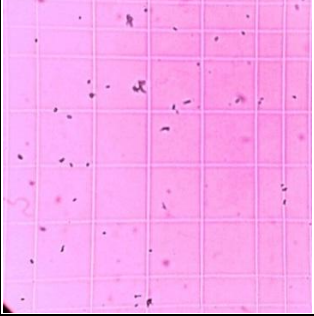
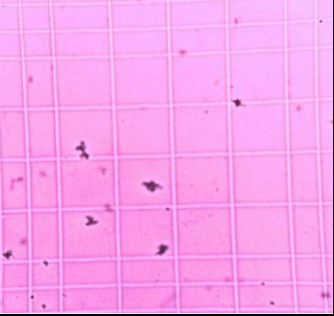
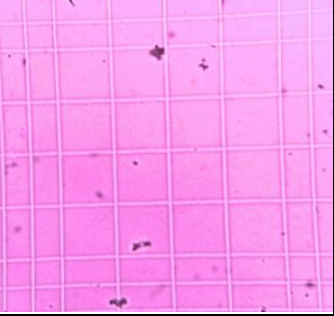
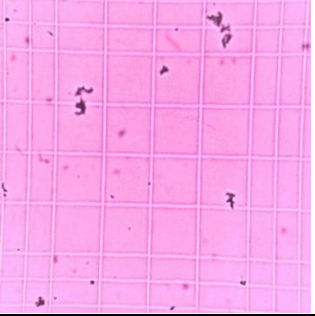
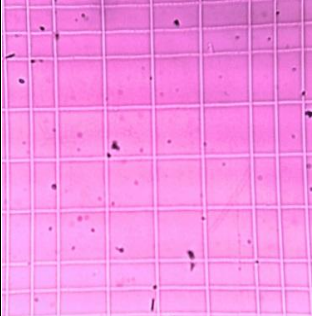
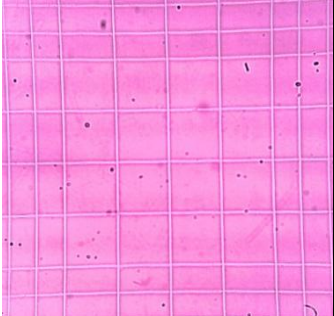
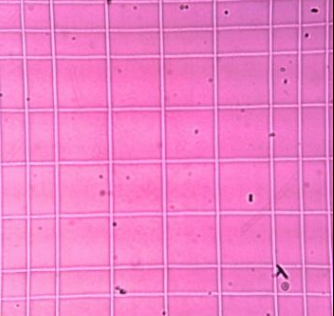
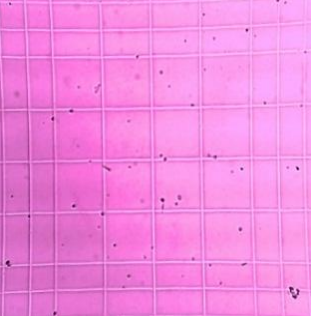
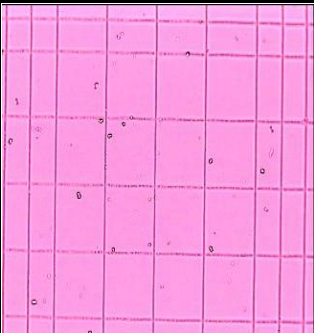
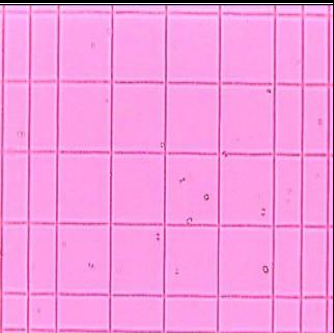
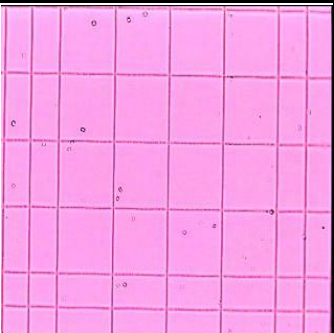
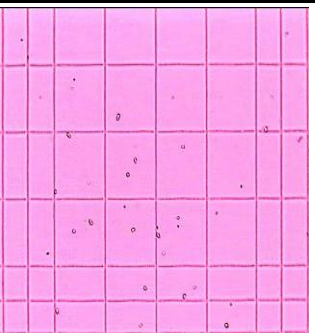
Ces résultats expliquent clairement l'inhibition de la formation des cristaux et des agrégats par l'extrait de *R. retam* de manière dose- dépendant.

Récemment kachcoul et al (2017), ont montré que les extraits méthanolique de *Punica granatum* et *Ammi visnaga* agissent au niveau des phases de la nucléation et de l'agrégation contrairement à notre extrait agit préférentiellement à la phase de croissance.

D'après les résultats de la méthode turbidimétrique et de la méthode microscopique, on peut confirmer que l'extrait aqueux de *R. retam*, montre un grand pouvoir anti-lithiasique vis-à-vis la cristallisation oxalocalcique.

L'effet inhibiteur de l'extrait aqueux pourrait être lié à sa richesse aux molécules bioactives telles que les polyphénols et les flavonoïdes qui agissent probablement par leur capacité à former des espèces solubles (complexe : principe active-calcium) ce qui diminue la formation des cristaux d'oxalate de calcium. De ce fait il peut être utilisé comme agent inhibiteur pour la prévention et/ou le traitement des calculs urinaires.

Tableau 07 : Cristallisation d'oxalate de calcium en absence et en présence de l'extrait

	10	20	25	55
SI				
0,5%				
5%				
50%				
100%				

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales anti-lithiasique peuvent offrir des avantages pour une meilleure prise en charge de lithiase rénale et ouvrent des perspectives thérapeutiques. Notre étude consiste à déterminer l'effet de l'extrait aqueux de la partie aérienne *R. retam* sur la cristallisation oxalo-calcique.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux à montrer la richesse de l'extrait aqueux de cette plant on polyphénols totaux (70,60 mgEAG/g d'extrait) par rapport aux flavonoïdes (8,44mg EQ/ g d'extrait).

La méthode turbidimétrique nous a permis de suivre la cinétique de cristallisation oxalocalcique et de déterminer le pouvoir d'inhibition de l'extrait étudié, qui présente un grand effet inhibiteur maximale de 88.46% pour une concentration de 1mg/ml.

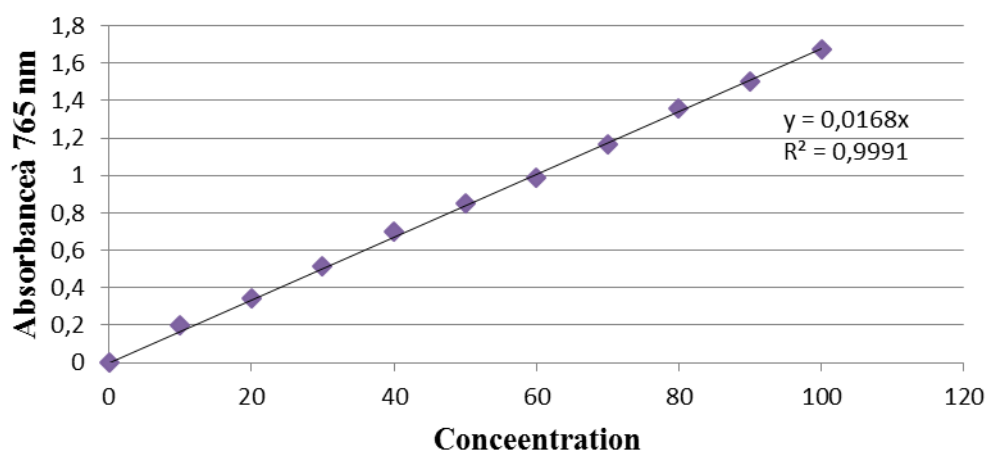
De même les résultats de suivi microscopique ont confirmées les résultats de la méthode turbidémétrique.

Ces résultats ont montré que l'extrait de *Retama retam* possède une activité inhibitrice dose dépendante sur la cristallisation oxalo-calcique *in vitro*. Cet effet anti-lithiasique peut être dû à leur richesse en composés biologiquement actifs, notamment les polyphénols.

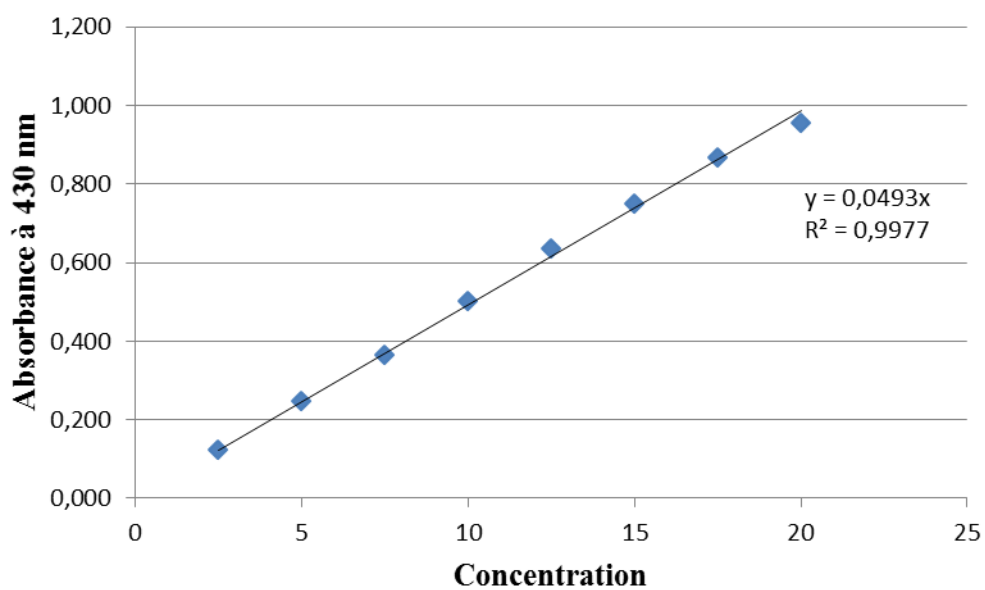
Par ailleurs, il serait très important de tester cet extrait dans un modèle *in vivo*. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination et la caractérisation par HPLC-MS des composées actives responsables de cette activité anti-lithiasique.

Annexes

Courbe d'etalonage d'acide gallique



Courbe d'etalonage de quercétine



*Références
Bibliographiques*

Références

- Abdelmalek, F., Harrache, D., Addoum, S., Semmoud, A., (2001).** Étude par turbidimétrie de la cristallisation oxalo-calcique en présence de quelques inhibiteurs. *Phys. Chem. News*, 4 96-107.
- Amar, A., Harrache, D., Atmani, F., Bassou, G., & Grillon, F. (2010).** Effet de *Parietaria officinalis* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium, dans l'urine. *Phytothérapie*, 8(6), 342-347.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C. and Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.
- Benaamar, S. (2018).** L'effet du Ramadane sur la lithogenèse : expérience de service d'urologie à l'Hôpital monétaire Moulay Ismail de Meknès. Thèse pour obtention le diplôme de Doctorat en Médecine. Université Sidi Mohammed Ben Abdallah. N ° 260-18.
- Benhelima, A., (2017).** Etude chimique et biologique des substances naturelles extraites par phytochimie et leurs effets sur les germes et cristaux oxalo-calciques. Thèse pour obtention le diplôme de Doctorat en chimie. Mostaganem, université abdelhamid ibn badis 173p.
- Benkhaled, A. (2018).** Activités anti-inflammatoire, anti-oxydante et antimicrobienne de l'extrait aqueux de *Limoniastrum guyonianum*. Thèse pour obtention le diplôme de Doctorat en Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. 124 p.
- Benkhaled, A., Senator, A., (2015).** Effects of Aqueous Leaf Extract of *Limoniastrum guyonianum* Pretreatment on Nickel Induced Acute Hemato-toxicity in Male Mice. *Global Veterinaria*, 15 (5): 493-497
- Benmiloud-Mahieddine, R., Abirached-Darmency, M., Brown, S. C., Kaid-Harche, M., & Siljak-Yakovlev, S. (2011).** Genome size and cytogenetic characterization of three Algerian *Retama* species. *Tree genetics & genomes*, 7(5), 987.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, In : Numéro spécial*, 79-82.

Bounar, R., Brini, F., & Bouzerzour, H. (2014). Ethnobotanical study of medicinal plants in Djebel messaad region (M'sila, Algeria). *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med*, 3(12), 445-459.

Ceorgé, S., Brat, P., and Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant derived products. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 53(5), 1370-1373.

Cochat, P., Bacchetta, J., Sabot, J. F., Bertholet-Thomas, A., & Demède, D. (2012). Lithiase urinaire de l'enfant. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 25(5), 255-268. doi.org/10.1016/j.jpp.2012.07.008.

Cotton, F., Wolff, F., Simon, I., Idrissi, M., Tielemans, C., VandenBossche, M., Roumeguère, T., et Pozdzik, A., (2014). Apport de la biologie clinique dans l'exploration étiologique et le suivi de l'urolithiase. *Revue médicale de Bruxelles*, (35) 4, 243-249.

Dalibon, P., (2015). La lithiase urinaire, une affection sous surveillance. *Actualités Pharmaceutiques*, 54(542), 23–29.

Daudon, M. (2000). L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant. *Archives de pédiatrie*, 7(8), 855-865.

Daudon, M. (2005). Épidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. In *Annales d'urologie* : 39(6), 209-231). doi.org/10.1016/j.anuro.2005.09.007.

Daudon, M., Traxer, O., Jungers, P., (2012). Lithiase urinaire. 2èd. Paris, Lavoisier, 641p.

Daudon, M., Traxer, O., Lechevallier, E., & Saussine, C. (2008). La lithogénèse. *Progrès en urologie*, 18(12), 815-827. doi : 10.1016 /j. purol.2008.09 .032.

Daudon, M. (2005). Épidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. *Annales d'urologie*. 39:209–231. Elsevier Masson.

Denu-Ciocca, C. J., & Colindres, R. E. (2011). Calculs urinaires (néphrolithiase). *Médecine Interne de Netter*, 1059–1065.

Djeddi, S., Karioti, A., Yannakopoulou, E., Papadopoulos, K., Chatter, R., & Skaltsa, H. (2013). Analgesic and antioxidant activities of Algerian *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel extracts. *Records of Natural Products*, 7(3), 169.

Djemoui, A. (2003). L'effet inhibiteur de l'extrait de quelques plantes sahariennes sur la lithiase urinaire type Oxalo-calcique, Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister, Université de Ouargla-Kasdi Merbah.

Eddouks, M., Maghrani, M., Louedec, L., Haloui, M., & Michel, J. B. (2008). Antihypertensive activity of the aqueous extract of *Retama raetam* Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats. *Journal of herbal pharmacotherapy*, 7(2), 65-77. doi:10.1300/J157v07n02_05.

El Lekhlifi, Z., Laziri, F., Boumzaoued, H., Maouloua, M., & Louktibi, M. (2014). Étude épidémiologique rétrospective sur la lithiase urinaire chez l'enfant dans la région de Meknès au Maroc (2000–2012). *Journal de pédiatrie et de puériculture* : 27(1), 23-28.

Gupta, M., Bhayana, S., & Sikka, S. K. (2011). Role of urinary inhibitors and promoters in calcium oxalate crystallisation. *Int J Research in Pharmacy and Chemistry*, 1, 793-798.

Hayet, E., Maha, M., Samia, A., Mata, M., Gros, P., Raida, H., ... & Mahjoub, A. (2008). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2933-2940. dOI 10.1007/s11274-008-9835-y.

Kachkoul, R., Houssaini, T. S., Miyah, Y., Mohim, M., El Habbani, R., & Lahrichi, A. (2018). The study of the inhibitory effect of calcium oxalate monohydrate's crystallization by two medicinal and aromatic plants : *Ammi visnaga* and *Punica granatum*. *Progrès en Urologie*, 28(3), 156-165.

Kassem, M., Mosharrafa, S. A., Saleh, N. A. M., & Abdel-Wahab, S. M. (2000). Two new flavonoids from *Retama raetam*. *Fitoterapia*, 71(6), 649-654.

Khitri, W., Lachgueur, N., Tasfaout, A., Lardjam, A., & Khalfa, A. (2016). Plantes anti lithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie. doi: 10.4000/ethnoecologie.2511.

Khouchlaa, A., Talbaoui, A., El Idrissi, A. E. Y., Bouyahya, A., Lahsen, S. A., Kahouadji, A., & Tijane, M. (2018). Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique in vitro sur la lithiase urinaire d'extrait de *Zizyphus lotus* L. d'origine marocaine. *Phytothérapie*, 16(1), 14-19. dOI 10.1007/s10298-017-1106-3.

Louis, S. (2004). *Diversité structurale et d'activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses* (Doctoral dissertation, INSA de Lyon). Méridionales Tome I. Paris : Centre National de la Recherche Scientifique. 462-475 p.

Ozenda, P. (1991). Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition. Paris : CNRS. 662 p.

Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A., & Mittler, R. (2002). Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *The Plant Journal*, 31(3), 319-330.

Quézel, P. et Santa, S. (1962). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1). Edition du C.R.N.S. France, p.1170.

Saadaoui, B., BEKIR, J., AKROUT, J., AMMAR, S., MAHJOUB, A., & MARS, M. (2007). Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Revue des régions arides*, 316-321.

Sadki, C., et 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. doi:10.1016/j.purol.2017.09.011.

Sbahi, K. (2017). Etude épidémiologique, paramétrique et phytothérapeutique de la lithiase .Thèse pour obtention du doctorat en Sciences.Mostaganem, Université Abdelhamid Ibn badis, 189p.

Sekkoum, K., Cheriti, A., Taleb, S., Belboukhari, N., & Djellouli, H. M. (2010). Inhibition effect of some Algerian Sahara medicinal plants on calcium oxalate crystallization. *Asian Journal of Chemistry*, 22(4), 2891.

Servais, A., Daudon, M., et Knebelman, B. (2006). Lithiases médicamenteuses. *Annales d'Urologie* : 40(2), 57–68. doi:10.1016/j.anuro.2006.01.002. doi:10.1016/j.anuro.2006.01.002.

Résumé

Retama retam (famille de Fabaceae) est largement utilisé dans la phytothérapie traditionnelle, et elle possède plusieurs activités biologiques. Dans ce contexte on a évalué l'activité anti-lithiasique de l'extrait aqueux de *Retama retam*, par la méthode turbidimétrique et microscopique sur la cristallisation oxalocalcique, qui représente le type lithiasique le plus fréquent dans le monde. *R retam* montre sa richesse en polyphénols totaux (70.60 µg EqAG/mg d'extrait), avec teneurs relativement faible en flavonoïdes (8.44 EQ/mg d'). Les résultats de l'étude de l'activité anti-lithiasique par les deux méthodes a montré que l'extrait aqueux de *R retam* à un grand effet inhibiteur de la cristallisation oxalocalcique avec un pourcentage d'inhibition de 88.46% pour une concentration de 1mg/ml.

Mots clés : *Retama retam*, activité anti-lithiasique, oxalate de calcium, turbidémétrie.

Abstract

Retama retam (Fabaceae family) is widely used in traditional herbal medicine, and she has several biological activities. In this context, the anti-lithiasic activity of the *Retama retam* aqueous extract was evaluated by the turbidimetric and microscopic method on oxalocalcic crystallization, which is the most common type of lithiasis in the world. *R retam* shows its richness of the polyphenols (70.60 µg EqAG / mg of extract), with relatively low levels of flavonoids (8.44 EQ / mg of). The results of the study of the anti-lithiasic activity by the two methods showed that the aqueous extract of *R retam* has a great inhibitory effect of the oxalocalcic crystallization with a percentage of inhibition of 88.46% for a concentration of 1 mg / ml.

Key words: *Retama retam*, anti-lithiasis activity, calcium oxalate, turbidimetry.

ملخص

Retama retam (عائلة Fabaceae) استعملت على نطاق واسع في التداوي بالأعشاب قديما ، والتي لديها العديد من الأنشطة البيولوجية.. في هذا السياق، تم تقييم النشاط المضاد لتشكل الحصى الكلوية للمستخلص المائي *R retam* عن طريق قياس العكورة والطريقة الميكروسكوبية لتبلور أوكسالات الكالسيوم التي تشكل النوع الأكثر إنتشارا في العالم من بين أنواع تشكل الحصى الكلوي. *R retam* أظهرت ثراءها بالبوليفينولات الكلية (70.60 ميكروغرام مكافئ / ملغ من المستخلص) ، مع مستويات منخفضة نسبيا من الفلافونويد (8.44 مكافئ / ملغ من). نتائج دراسة النشاط المضاد لتشكل الحصى الكلوية بكلتا الطريقتين أن المستخلص المائي لـ *R retam* له قدرة تثبيطية كبيرة على تبلور أوكسالات الكالسيوم مع نسبة تثبيط قدرها 88.46 % لتركيز 1 ملغ. / مل.

الكلمات المفتاحية: *Retama retam*, النشاط المضاد لتشكل الحصى الكلوية, أوكسالات الكالسيوم, العكورة.

