

Inhibition de la cristallisation in vitro de l'oxalate de calcium par extrait aqueux de Zizyphus Lotus

Latifa baddade, Mustapha El Bir, Mustapha Oubenali, Malika Echajia, Souad Rabi, Mohamed Berkani, and Mohamed Mbarki

University of Sultan Moulay Slimane, Faculty of Science and Technology, P.B 523, Beni Mellal, Morocco

Copyright © 2018 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: In the context of sustainable development and promoting natural resources, some forgotten fruits such as the Zizyphus Lotus can be developed as local products. In addition, the frequency of Urolithiasis multiplied increasingly rapidly in the world. The Urolithiasis involves the formation of crystalline aggregates called "urinary stones" developed in the urinary tract, usually in the kidneys or ureters, but may also affect the bladder or urethra. The objective of this study is to study in vitro the crystallization of calcium oxalate as a lithogenic species and to investigate the inhibitory effect of aqueous jujube extracts on the crystallization of calcium oxalate in order to exploit it. Six jujube fruit samples were taken from six geographical zones from Beni Mellal-Khenifra region. These fruit - seed samples were separated from their seeds. The pulps were subjected to a grinding mortar so as to have fine powder. The samples have been subsequently, submitted a cold maceration during 48 hours. The study of the crystallization of calcium oxalate is carried out by the optical microscope with polarized light (MLP). Some aqueous extracts have an anti-lithiasic effect on the aqueous solution of the lithogenous species studied.

KEYWORDS: Urolithiasis, calcium oxalate, crystallization, PLM, valorization, Zizyphus Lotus, anti-lithiasic effect.

RÉSUMÉ: Dans le contexte du développement durable et de la valorisation des ressources naturelles, certains fruits dits oubliés comme le cas de Zizyphus Lotus peut être développés en tant que produits locaux. En outre, la fréquence d'uro lithiase augmente de plus en plus dans le monde. L'uro lithiase consiste à la formation des agrégats cristallins appelés « pierres urinaires » développés dans l'appareil urinaire, habituellement dans les reins ou les uretères, mais peut également affecter la vessie ou l'urètre. L'objectif de cette étude est d'étudier la cristallisation in vitro d'oxalate de calcium comme espèce lithogène et de chercher l'effet inhibiteur des extraits aqueux du jujube sur la cristallisation de l'oxalate de calcium pour le valoriser. Six échantillons de fruits de jujube ont été prélevés sur six zones géographiques de la région de Béni Mellal-Khenifra. Ces échantillons fruits - graines ont été séparés de leurs graines. Les pulpes ont été broyées à l'aide d'un mortier de façon à avoir une poudre fine. Les échantillons par la suite ont été soumis à une macération à froid pendant 48 heures. L'étude de la cristallisation de l'oxalate de calcium est réalisée grâce au microscope optique à lumière polarisé (MLP). Certains extraits aqueux présentent un effet anti- lithiasique sur la solution aqueuse de l'espèce lithogène étudié.

MOTS-CLEFS: Urolithiase, oxalate de calcium, cristallisation, MLP, valorisation, Zyziphus Lotus, effet anti-lithiasique.

1 INTRODUCTION

L'incidence mondiale de l'uro lithiase augmente et l'oxalate de calcium (CaC_2O_4) est le principal constituant de la majorité des pierres formées dans le système urinaire des patients atteints d'uro lithiase [1]. L'oxalate de calcium peut rencontrer sous trois formes cristallographiques différentes qui sont déterminées par le nombre de H_2O dans la formule unitaire. On distingue l'oxalate de calcium monohydraté $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: COM ou Whewellite ; l'oxalate de calcium dihydraté $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: COD ou Weddellite et l'oxalate de calcium trihydraté $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: COT ou CaOxite [2]. Le jujubier (zizyphus lotus) est un arbuste épineux appartenant à la famille des Rhamnacées et communément appelé au Maroc *Sedra*, *Zarb*, *Azouggar* ou *Tazougart* [3].

Il est réparti dans les régions tropicales et subtropicales, tel que l'Asie, l'Afrique, le nord d'Amérique, le sud d'Amérique, les océans et l'Europe avec une diversité qui se centre dans l'Asie [4]. Au Maroc, cette espèce est localisée dans différentes régions, principalement des zones semi-arides telles que la région de Béni Mellal - khenifra. Zizyphus Lotus (Z. Lotus) est dormant d'octobre à mars et fleurit des plantes matures en mai et juin et produit des fruits en août [5]. Les fruits de cette plante sont utilisés dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies telles que la bronchite, diabète, diarrhée et abcès [6]. D'ailleurs, elle possède des activités thérapeutiques : activité anti-ulcère [7]; activité anti-inflammatoire, analgésique [8] et activité antispasmodique [9]. Le présent travail a pour but de chercher l'activité anti-lithiasique des extraits aqueux de Zizyphus Lotus. La première démarche de la recherche consiste à étudier la cristallisation de l'oxalate de calcium in vitro en tant qu'espèce lithogénique rencontrée aux calculs urinaires. La deuxième étape de ce travail est de chercher l'effet inhibiteur de Z. Lotus sur la cristallisation de l'oxalate de calcium.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les fruits de jujubier ou Zizyphus Lotus (Z. Lotus) ont été collectés depuis le mois septembre 2015-2016 de six zones de la région de Béni Mellal - khénifra : Oulad Ayyad, Ouad Zem, Tagelift, El Ksiba, Tagzirt et Béni Mellal. Chaque échantillon comporte une centaine de graine de fruit. Les fruits ont été d'abord dénoyautés puis la pulpe a été broyée à l'aide d'un mortier afin de conserver leurs composantes principales et pour obtenir une poudre fine qui va servir à la préparation des extraits aqueux (figure1).

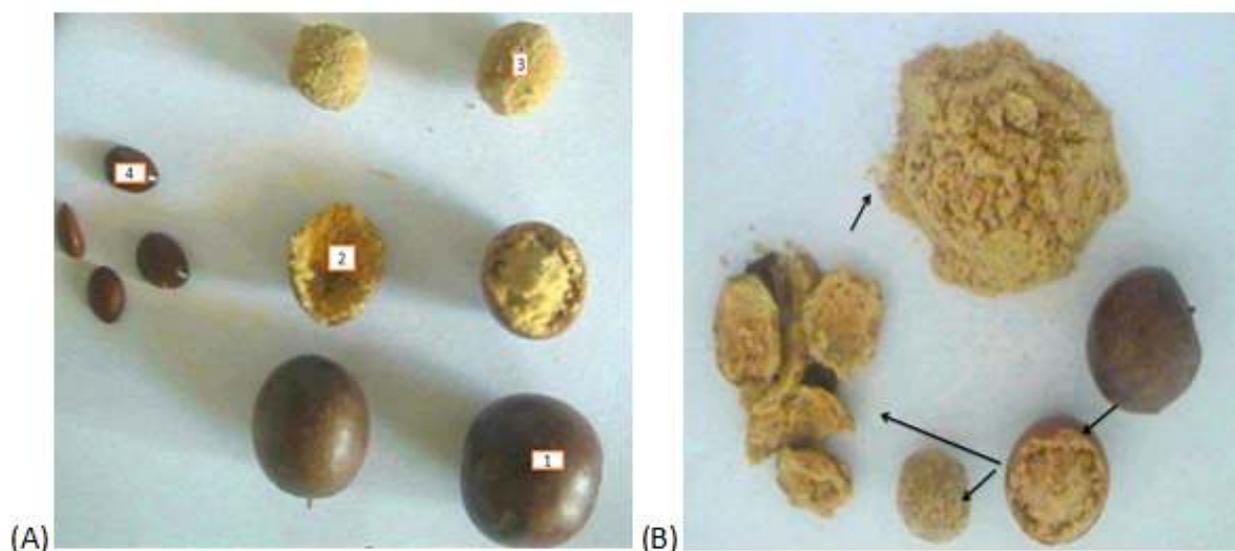


Fig. 1. (A) : les différents constituants de Zizyphus Lotus, 1 : fruit, 2 : pulpe, 3 : noyau, 4 : amandes. (B) : étapes d'obtention de la poudre fine de la pulpe de Zizyphus Lotus

2.2 PRÉPARATION DES EXTRAITS AQUEUX

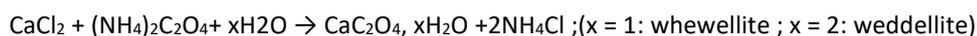
Les extraits aqueux ont été préparés dans l'eau distillée à des concentrations de 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 et 10 mg/ml de la poudre de Z. Lotus. Chaque extrait aqueux soumis à une macération à froid dans l'eau distillée durant 48 heures à 4°C.

2.3 CRISTALLISATION DE L'OXALATE DE CALCIUM IN VITRO

2.3.1 SANS EXTRAITS AQUEUX

Les cristaux de CaC_2O_4 ont été préparés en mélangeant dans l'eau distillée les deux réactifs suivants : chlorure de calcium (CaCl_2) et l'oxalate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$) à des concentrations dans l'ordre croissant : 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; $5 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-2} mol/l d'oxalate de calcium cristallisé. Ensuite les deux solutions du chlorure de calcium (CaCl_2) et l'oxalate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$) ont été mises au Bain Marie à $T = 37^\circ\text{C}$ et $\text{pH} = 6,5$ sous agitation comme dans le cas des conditions physiologiques de l'urine.

Le précipité CaC_2O_4 une fois formé tend à subir une hydratation selon la réaction :



L'indice d'hydratation (x) est évalué par Microscope Optique à Lumière Polarisée (MLP)

2.3.2 EN PRESENCE D'EXTRAITS AQUEUX

La cristallisation de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ en présence d'extraits de pulpe de jujube dans la solution de choix a été suivie en milieu aqueux à $T=37^\circ\text{C}$ et $\text{pH}=6,5$. Les extraits aqueux ont été préparés à des concentrations de 1, 2, 4, 5, 6, 8 et 10 mg/ml de la poudre de *Zizyphus Lotus* afin de détecter la concentration correspondant à l'effet anti-lithiasique de l'espèce litho-génique étudiée.

2.4 MICROSCOPE OPTIQUE A LUMIERE POLARISEE

Après 2heures d'agitation de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium, on pose une goutte entre lame et lamelle à l'aide d'une pipette pasteur et grâce au microscope optique à lumière polarisée, marque YJ2005 et OLYMPUS (Figure 2), pour visualiser la morphologie et observer le développement des cristaux de l'oxalate de calcium dans la solution aqueuse en fonction de la concentration. En présence de l'extrait aqueux de *Z. Lotus* on observe sur microscope leur effet inhibiteur sur la cristallisation de l'oxalate de calcium.



Fig. 2. Microscope optique à lumière polarisée. (A) : marque YJ2005, (B) : marque OLYMPUS

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 CRISTALLISATION DE L'OXALATE DE CALCIUM IN VITRO EN MILIEU AQUEUX SANS EXTRAITS

Le développement des cristaux de l'oxalate de calcium sur la cellule de Malassez a eu lieu après agitation magnétique des deux réactifs dans de l'eau distillée en fonction de la teneur croissante de l'oxalate de calcium : 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-2} mol/l.

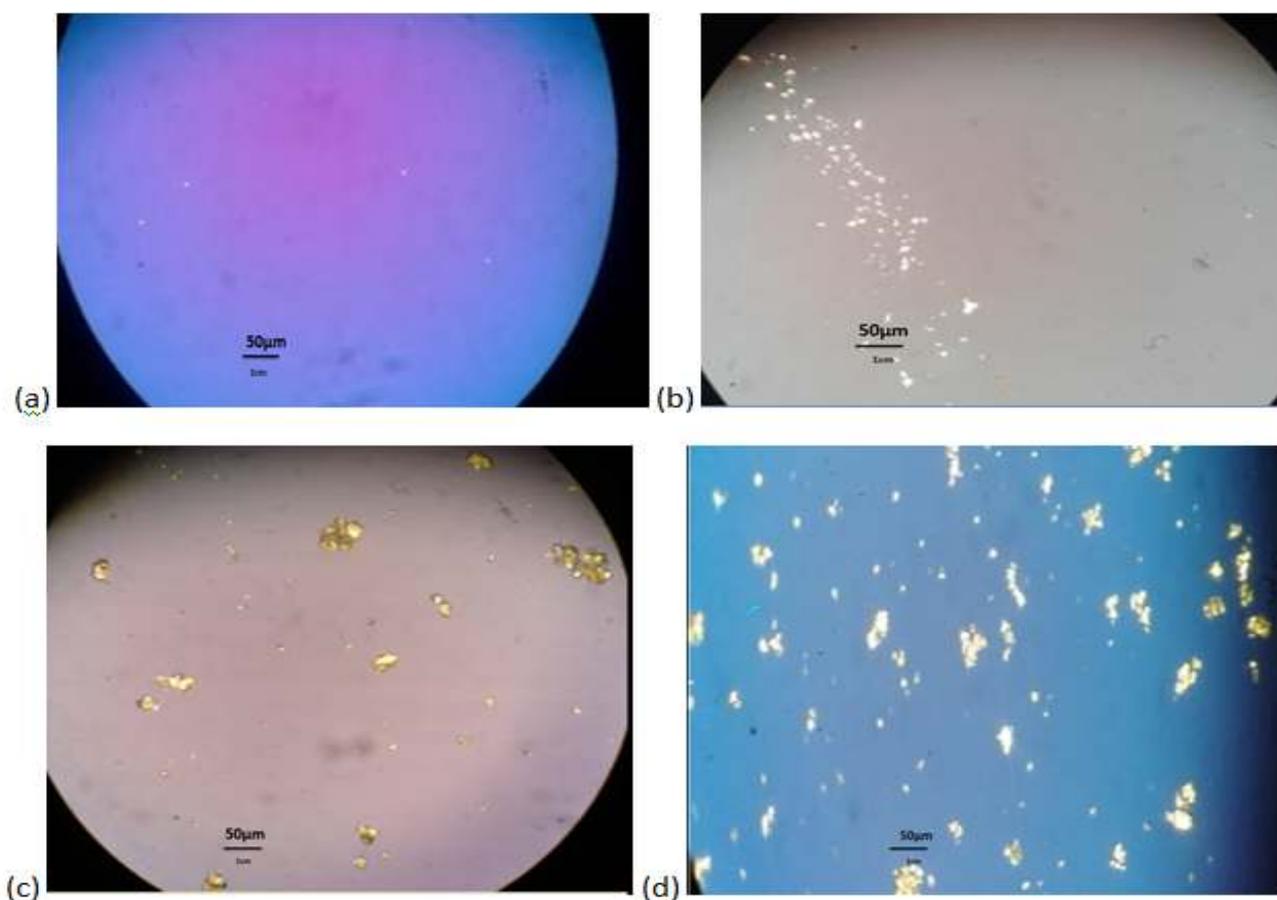


Fig. 3. Photographie à partir du microscope optique à lumière polarisé (Grossissement=200) de solution aqueuse de l'oxalate de calcium sans extrais : (a) 10^{-5} mol/l de l'Oxalate de calcium, (b) 10^{-4} mol/l de l'Oxalate de calcium, (c) 5.10^{-3} mol/l de l'Oxalate de calcium et (d) 10^{-2} mol/l de l'Oxalate de calcium

D'après ces résultats on remarque que le nombre des cristaux augmentent et forment des agrégats de manière proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'oxalate de calcium (Figures 3).

3.2 RESULTATS DE CRISTALLISATION DE L'OXALATE DE CALCIUM EN PRESENCE DE L'EXTRAIT

On utilise une méthode classique de synthèse de l'urine super saturé avec dichlorure de calcium CaCl_2 et l'oxalate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ pour déterminer le développement et l'agrégation des cristaux de l'oxalate de calcium. D'après les résultats de la cristallisation de l'oxalate de calcium in vitro, on trouve que la dilution par l'eau distillée fait réduire les agrégats de l'oxalate de calcium en nombre et quantité. Ainsi en effectuant trois essais pour chaque concentration, le développement des cristaux de l'oxalate de calcium a été effectué après agitation magnétique de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration de 10^{-2} mol/l en fonction de la teneur de l'extrait aqueux de la pulpe de Z. Lotus. On prend un même volume ($V=10$ ml) de l'extrait aqueux de Z. Lotus et de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration de 10^{-2} mol/l et on observe au microscope à un grossissement de 200. Ensuite on modifie la teneur de l'extrait aqueux de Z. Lotus afin de détecter la concentration minimale de l'extrait aqueux de la pulpe de Z. Lotus susceptible d'inhiber la cristallisation de l'oxalate de calcium. D'où une solution de l'oxalate de calcium 5.10^{-3} mol/l en présence de l'extrait aqueux de Z. Lotus. Deepti et al [10], ont étudié l'effet anti-lithiasique d'extrait aqueux de feuilles d'album de Chenopodium, album qui inhibait la cristallisation in vitro du cristal d'oxalate de calcium. Aussi l'extrait de Blumea. balsamifera de dose de 0,5 et 1 mg/ml a diminué la taille du cristal d'OxCa de 5,22% et 82,69%, a déplacé la phase des cristaux en COD et a inhibé l'agrégation des cristaux, cherché par [11]. Sarsimtha et al [12], ont travaillé sur des extraits aqueux et alcoolique de rhizome de Bergenia Ciliata afin de trouver leur effet inhibiteur de la nucléation et l'agrégation des cristaux de l'oxalate de calcium. Charles et al [13] ont étudié l'effet de di sodium ethane -1-hydroxy -1,1-diphosphonate(EHDP) sur la cristallisation de l'oxalate de calcium en solution aqueuse in vitro. EHDP augmente le produit de formation de l'oxalate de calcium ce qui indique une inhibition de la nucléation de l'oxalate de calcium. Une recherche faite par Frackwiak et al [14], décrit une méthode d'isolement des fractions solubles et insolubles dans

le méthanol provenant de *Humulus lupulus* L. enrichi en composés qui inhibent la formation d'oxalate de calcium. Les deux fractions pourraient être efficaces dans le traitement de la maladie des calculs rénaux. Sarsimtha et al [15], ont cherché l'effet anti-cristallisant vis-à-vis de l'oxalate de calcium par extrait de la graine de *dolichos biflorus* in vitro. Le Magnésium, le citrate et le phytate sont des Inhibiteurs de cristallisation de l'oxalate du calcium, empêchant la formation de monohydrate et de trihydrate de l'OxCa et évite la cristallisation de l'oxalate de calcium en diminuant sa supersaturation c'est une étude faite par Rodriguez et al [16]. Pour ce travail, la prise d'un même volume de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium et de l'extrait aqueux de *Z. Lotus* élimine l'effet de la dilution sur l'agrégation par l'ajout de la solution aqueuse de l'extrait aqueux de *Z. Lotus*. Les cristaux de l'oxalate de calcium de concentration 5.10^{-3} mol/l sans extrait sont de grande taille et forment des agrégats (figure 4). Avec extrait aqueux et avec la croissance de la teneur de l'extrait aqueux de la pulpe de *Z. Lotus*, il y a inhibition de la cristallisation de l'oxalate de calcium à partir de la concentration de l'ordre de 4 mg/ml de *Z. Lotus*. En présence de 10 mg/ml de *Z. Lotus* il y a une dissociation remarquable des agrégats (Figure 5).

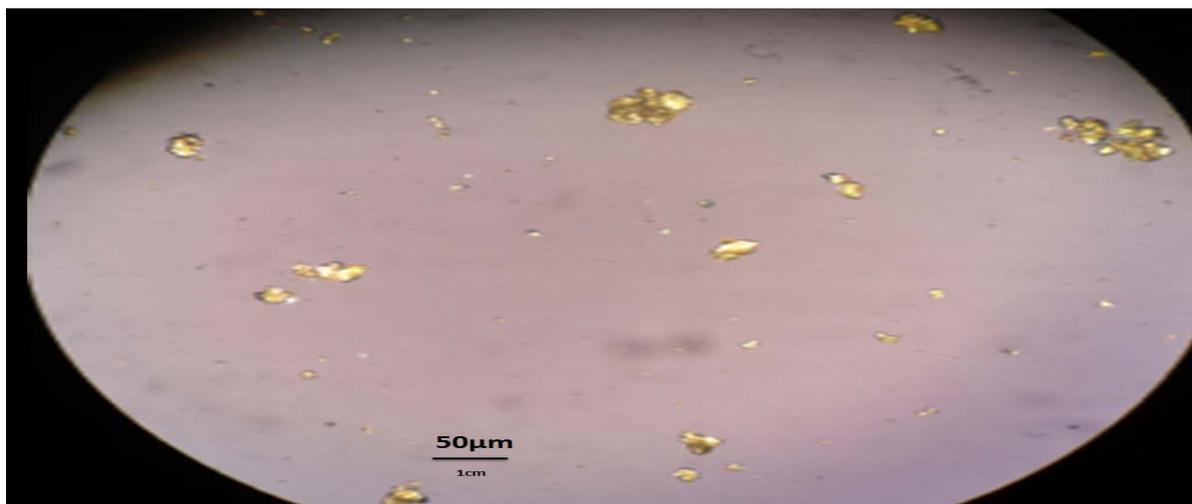


Fig. 4. Photographie à partir du microscope optique à lumière polarisé (Grossissement=200) de la solution aqueuse de l'Oxalate de calcium sans extrais de concentration de 5.10^{-3} mol/l

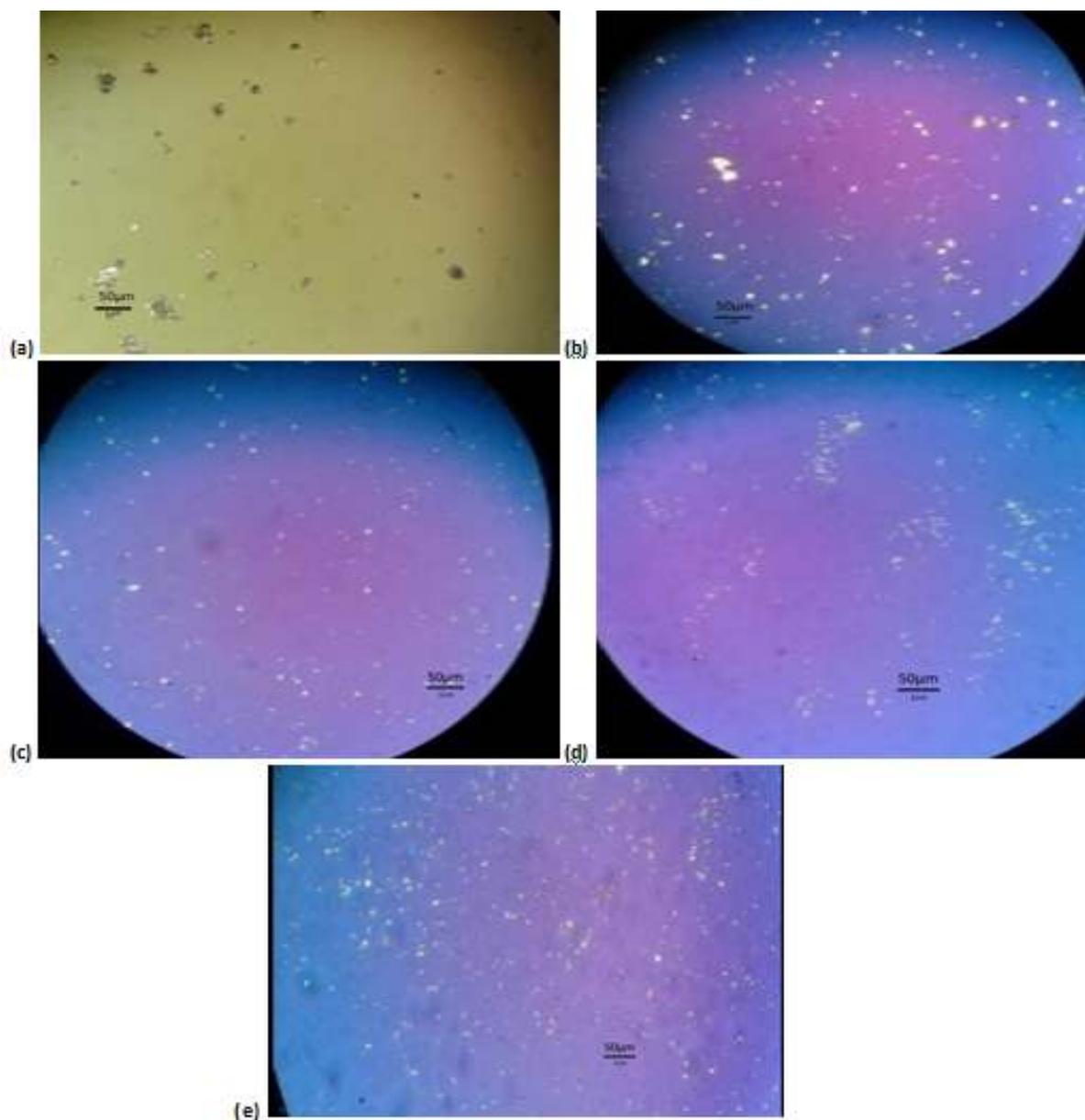


Fig. 5. Photographe à partir du microscope optique à lumière polarisé (Grossissement=200) de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration 5.10^{-3} mol/l avec extrait : (a) 1 mg/ml de l'extrait aqueux de Z. Lotus, (b) 4 mg/ml de l'extrait aqueux de Z. Lotus, (c) 7 mg/ml de l'extrait aqueux de Z. Lotus, (d) 8 mg/ml de l'extrait aqueux de Z. Lotus et (e) 10mg/ml de l'extrait aqueux de Z. Lotus.

4 CONCLUSION

Cette étude montre que l'extrait aqueux de Zizyphus Lotus présenterait un effet anti cristallisant vis-à-vis de l'oxalate de calcium in vitro à partir d'une concentration de 4 mg/ml. On a pu aussi arriver à valoriser une technique d'analyse de routine dans les laboratoires d'analyse qui est le Microscope Optique à Lumière Polarisé (MOLP) afin d'être exploiter l'étude de la lithiase. Une étude complémentaire sur l'urine humaine devrait porter un éclaircissement à ce niveau. C'est l'étude in vivo et les essais cliniques qui sont déterminants et tranchants dans la question de la valorisation thérapeutique de la plante de jujubier. Comme perspective de présent travail il y a besoin d'une étude plus poussée in vitro et in vivo sur d'autres constituants du fruit de jujubier (Zizyphus Lotus) tels que le noyau.

REFERENCES

- [1] A. Trinchierie, "Epidemiology of urolithiasis an update", *Clin Cases Miner Bone Metab*, vol. 5, no. 2, pp. 101-6, 2008.
- [2] C. Conti, M. Casati, C.Colombo, E. Possenti, M. Realini, G. Diego Gatta, Marco Merlini, Luigi Brambilla, and G. Zerbi, "Synthesis of calcium oxalate trihydrate: New data by vibrational spectroscopy and synchrotron X-ray diffraction", *Spectrochimica Acta Part : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 150, pp. 721-730, 2015.
- [3] N. Rsaissi and M. Bouhache, "lutte chimique contre le jujubier, programme national de transfert de technologie en agriculture" (*PNTTA*), *DERD*, no. 94, pp. 4, 2002.
- [4] J.E. Richardson, L.W. Chatrou, J.B. Mols, R.H.J. Erkens, and M.D. Pirie, "Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae", *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 359, pp. 1495–1508, 2004.
- [5] M. Maraghni, M. Gorai, and M. Neffati, "Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Zizyphus lotus*", *South African Journal of Botany*, vol. 76, pp. 453–459, 2010.
- [6] Le-Floc'h, Édouard., 1983. "Contribution à une étude ethnobotanique de la flore de la Tunisie", *Publication Scientifique Tunisiennes*, p.150.
- [7] W. Borgi, A. Bouraoui, and N.Chouchane, "Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 112, pp. 228–231, 2007.
- [8] W. Borgi, K. Ghedira, and N. Chouchane, "Anti- inflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks", *Fitoterapia* , vol. 78, pp. 16-19, 2007.
- [9] W. Borgi, and N. Chouchane, "Anti-spasmodic effects of *Zizyphus lotus*(L) Desf. extracts on isolated rat duodenum", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 126, pp. 571–573, 2009.
- [10] S. Deepti, Y.N. Dey, I. Sikarwar, R. Sijoria, M.M. Wanjari, and A.D. Jadhav, "In vitro study of aqueous leaf extract of *Chenopodium album* for inhibition of calcium oxalate and brushite crystallization", *Egyptian journal of basic and applied sciences*, vol. 3, pp. 164-171, 2016.
- [11] C. M. Montealegre, R. L. De Leon, "Effet of *Blumea balsamifera* extract on the phase and morphology of calcium oxalate crystals", *Asian Journal of Urology*, vol. 4, pp. 201-207, 2016.
- [12] S. Sarmistha, R. J. Verma, "Inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by an extract of *Bergenia ciliata*", *Arabe Journal of Urology*, vol. 11, pp. 187-192, 2013.
- [13] Y.C.P. Charles, M. Ohata, K. Holt, "Effect of diphosphonate on crystallization of calcium oxalate in vitro", *Kidney International*, Vol. 7, pp. 154-160, 1975.
- [14] A. Frackwiak, T. Kozlecki, P. Skibinski, W. Gawel, E. Zaczynska, A. Czarny, K.Piekarska, R. Gancarz, "Solubility, inhibition of crystallization and microscopic analysis of calcium oxalate crystals in the presence of fraction from *Humulus lupulus L*", *Journal of Crystal Growth*, vol. 312, pp. 3525-3532, 2010
- [15] S. Sarmistha, R.J. Verma, "Evaluation of hydro-alcoholic extract of *Dolichos biflorus* seeds on inhibition of calcium oxalate crystallization", *Journal of Herbal Medicine*, vol. 5, pp. 41-47, 2015.
- [16] A. Rodriguez, A. Costa-Bauza, R.M. Prieto, F. Berga, F. Grases, "Magnesium, citrate and phytate: Effect binary mixtures as calcium oxalate crystallization inhibitors in urine", *European urology supplements*, vol. 14, pp. 29-78, 2015.