



ETUDE PAR TURBIDIMETRIE DE LA CRISTALLISATION OXALOCALCIQUE EN PRESENCE DE QUELQUES INHIBITEURS

F. Abdelmalek¹, D. Harrache², A. Addou^{1*}, S. Taleb², A. Semmoud³

¹Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement et de la Valorisation (STEVA);
Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur; Université de Mostaganem.

²Laboratoire de Chimie; Faculté des Sciences; Université de Sidi-Bel-Abbes. Algérie.

³Laboratoire LASIR, Bat C5, Université des Sciences et Technologies de Lille; 59655 Villeuve d'Acq. France

* Corresponding author. E-mail: addou@univ-mosta.dz

Received : 18 January 2001; revised version accepted 05 October 2001

Abstract

The inhibition of the calcium oxalate crystallization is investigated using a turbidimetric model by means of a UV/VIS spectrometer. The turbidity of thermostatic solution at 37° C under constant agitation is measured at 620 nm. The solutions concentrations of calcium chloride CaCl₂ and sodium oxalate C₂O₄Na₂ in the test were respectively 4 and 0.5 mmol.L⁻¹. The investigated inhibitors were magnesium ions between 2.10⁻¹ et 7 mmol.L⁻¹, citric acid between 10⁻³ et 4 mmol.L⁻¹, fluoride between 1 et 12 mmol.L⁻¹ and ferrous ion between 0.1 and 0.4 mmol.L⁻¹. We have used physiologic concentrations in order to work near the best conditions of calculus formation. The rates of inhibition obtained from the turbidimetric slopes with and without inhibitors were measured as a mean of 6 experiments. The CV observed were at 5% lower. The effect of these inhibitors on the crystallization phases has been followed with an optical microscope photography with a polarised light. The results at the used observation scale showed that the magnesium act the nucleation and the aggregation; citric acid on the three crystallization phases (nucleation, crystalline growth and aggregation) and finally fluoride and ferrous ions on the nucleation and crystalline growth.

Keywords: Turbidimetry ; Calcium oxalate ; Inhibition ; Crystallization phases.

Résumé

L'inhibition de la cristallisation oxalocalcique a été étudiée dans un modèle turbidimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS. La turbidité des solutions thermostatées à 37°C sous agitation constante a été suivie à 620 nm. Les concentrations des solutions du chlorure de calcium CaCl₂ et de l'oxalate de sodium C₂O₄Na₂ dans le test étaient respectivement de 4 et 0,5 mmol.L⁻¹. Les inhibiteurs étudiés étaient les ions magnésium entre 2.10⁻¹ et 7 mmol.L⁻¹, l'acide citrique entre 10⁻³ et 4 mmol.L⁻¹, le fluorure entre 1 et 12 mmol.L⁻¹ et les ions ferreux entre 0,1 et 0,4 mmol.L⁻¹. Nous avons travaillé avec des concentrations physiologiques pour se rapprocher au mieux des conditions de formation des calculs. Les pourcentages d'inhibition calculés à partir des pentes turbidimétriques en présence et en absence d'inhibiteur étaient calculés comme la moyenne de 6 expériences. Les CV observés étaient inférieurs à 5%. L'effet de ces inhibiteurs sur les étapes de cristallisation a été suivie par photographie au microscope optique à lumière polarisée. Les résultats à l'échelle d'observation utilisée, ont montré que le magnésium agissait sur la nucléation et l'agrégation; l'acide citrique sur les trois phases de cristallisation (nucléation, croissance cristalline et agrégation); enfin, le fluorure et les ions ferreux sur la nucléation et la croissance cristalline.

Mots clés : Turbidimétrie ; Oxalate de calcium ; Inhibition ; Phases de cristallisation.

1. Introduction

L'oxalate de calcium est le principal composant des calculs urinaires identifié dans la plus part des études publiées depuis une quarantaine d'années [1-3]. Il est majoritaire dans 57 à 80% des calculs analysés et se présentent fréquemment sous deux formes cristallines, l'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) et l'oxalate de calcium dihydraté (weddelite). Dans le cadre de la formation des calculs oxalocalciques, le risque

cristallogène est lié à une rupture d'équilibre entre les substances promotrices telles l'oxalate et le calcium et les substances inhibitrices qui sont capables de ralentir ou d'empêcher la formation de l'oxalate de calcium. Dans le but de diminuer ce facteur cristallogène et éviter la formation des calculs par précipitation de l'oxalate de calcium, nous avons entrepris l'étude in-vitro sur l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique en présence de substances chimiques susceptibles

d'inhiber le processus de précipitation.

2. Matériel et méthode

Les travaux réalisés sur les processus de cristallisation et d'inhibition in vitro ont permis de préciser les conditions thermodynamiques et cinétiques de la cristallisation de l'oxalate de calcium et de tester l'activité et le pouvoir d'inhibition de substances chimiques et/ ou naturelles [4]. Le modèle d'étude des inhibiteurs de la cristallisation oxalocalcique 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 [5]. La turbidimétrie est une méthode optique qui mesure le trouble (absorbance) qui existe dans une solution. La valeur de l'absorbance A est déterminée par rapport à une valeur de référence et s'exprime par

$$A = \text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right), \quad (1)$$

où I_0 représente l'intensité lumineuse du rayon

incident et I l'intensité transmise à la cellule photoélectrique. On définit à partir de la relation (1) la turbidité T d'une solution par

$$T = \frac{1}{l} \cdot xA = \frac{1}{l} \text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right), \quad (2)$$

où l désigne la longueur du trajet optique parcouru par le rayon lumineux dans la cuve. L'allure générale des courbes turbidimétriques obtenues (absorbance en fonction du temps) est représentée à la figure 1 et peut être divisée en trois parties:

- Un temps de latence durant lequel l'absorbance est pratiquement nulle correspondant ainsi à la phase de nucléation cristalline et qui est caractérisé par un temps d'induction t_i .
- Une phase ascendante de forte croissance, linéaire sur une large partie de temps correspondant à la croissance cristalline. Elle est caractérisée par un deuxième paramètre cinétique qui est la pente turbidimétrique.
- Enfin, une lente décroissance passant par un maximum et traduisant la phase d'agrégation qui présente un intérêt important dans l'étude de la cristallisation.

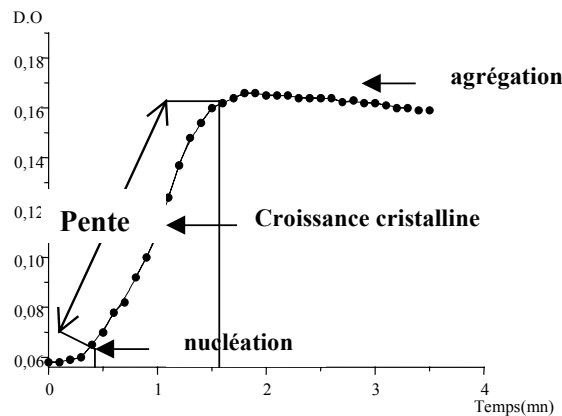


Figure 1 : Allure générale de la courbe turbidimétrique sans inhibiteur.

Le modèle turbidimétrique que nous avons utilisé permet de travailler à des pH, température et agitation contrôlés. Les opérations manuelles effectuées sont ainsi très limitées et permettent de réduire au minimum des erreurs expérimentales systématiques. Ce modèle possède aussi l'avantage de quantifier le pouvoir inhibiteur exprimé en % par rapport à un témoin. Il est donné par la formule (3)

$$\% I = \left[1 - \left(\frac{P_{SI}}{P_{AI}} \right) \right] \times 100, \quad (3)$$

où P_{AI} et P_{SI} représentent respectivement les valeurs des pentes turbidimétriques avec et sans inhibiteur.

La cristallisation oxalocalcique a été étudiée dans le modèle turbidimétrique en solution aqueuse à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS 550S Perkin Elmer thermostaté à l'aide d'un bain marie, maintenant une circulation des solutions à la température de travail. Toutes nos solutions sont maintenues à 37°C sous agitation magnétique constante contrôlée par un agitateur magnétique de type KMO2 IKM.

Nous avons utilisé les solutions mère de chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) et d'oxalate de sodium ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) respectivement à 40 et 4 mmol.L^{-1} et les solutions filles à différentes concentrations 30; 20; 10; 5 et 4 mmol.L^{-1} pour Ca^{2+} et 3; 2; 1 et 0,5 pour $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$. Les inhibiteurs

que nous avons testés sont: l'ion magnésium Mg^{2+} , l'ion ferreux Fe^{2+} et l'ion fluorure F^- préparés respectivement à partir de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; $FeCl_2 \cdot 4H_2O$; NaF et enfin l'acide citrique $C_6H_8O_7$.

Les dilutions ont été effectuées avec une solution de $NaCl$ afin d'amener la force ionique à une valeur constante de 0,15M. Les produits chimiques utilisés sont des produits Merck.

3. Méthodologie

3.1 Cinétique de cristallisation en l'absence de l'inhibiteur

Le dispositif expérimental que nous avons mis au point possède l'avantage de maintenir une agitation constante, une température fixe à $37^\circ C$ et une introduction des solutions à la même température. Un volume de 70 ml de solution de chlorure de calcium est versé dans un ballon tricol placé dans un bain marie thermostaté à la température de travail sous agitation continue. La solution circule à travers un tuyau relié à une cuve de circulation en quartz de 1,5 ml de volume et de 1 cm de trajet optique, munie d'une entrée et d'une sortie reliées au ballon tricol. La cuve est installée dans le spectrophotomètre UV/VIS. La solution de chlorure de calcium $CaCl_2$ traverse la cuve et arrive au ballon tricol à l'aide d'une pompe péristaltique Multifix de type M80 à mouvement rotatoire. L'absorbance est lue contre l'eau distillée à 620 nm.

Dès que l'absorbance est stable, nous ajoutons un volume de 70 ml d'oxalate de sodium préalablement maintenu à $37^\circ C$ à la solution de chlorure de calcium et nous déclenchons immédiatement la mesure. L'absorbance est mesurée toutes les 6 secondes pendant une durée moyenne de 20 minutes. Ainsi, nous obtenons la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps dont l'allure est donnée à la figure 1. Nous déterminons alors, le temps d'induction T_i qui correspond au temps écoulé entre l'addition de l'oxalate de sodium et le moment où la croissance est expérimentalement mesurable. La courbe admet une plage linéaire où le coefficient de corrélation R^2 supérieur à 99% est caractérisée par la pente turbidimétrique. Pour tous nos essais dans des conditions initiales identiques, nous avons répété 6 fois l'essai, ce qui nous permet de déterminer pour les 6 pentes turbidimétriques, la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation CV qui doit être inférieur à 10%.

3.2 Cinétique de cristallisation en présence de l'inhibiteur

Les concentrations des inhibiteurs testés étaient

des concentrations physiologiques, avec pour l'acide citrique de 10^{-3} à 4 mmol.L^{-1} , le fluorure entre 1 et 12 mmol.L^{-1} , l'ion magnésium entre $2 \cdot 10^{-1}$ et 7 mmol.L^{-1} et l'ion ferreux entre 0,25 et $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$. Toutes les expériences ont été menées à pH constant, 5,5 pour l'acide citrique et 7 pour les autres inhibiteurs et une force ionique de 0,15M. Les pourcentages d'inhibition déterminés à partir des pentes turbidimétriques en présence et en absence d'inhibiteur étaient calculés comme la moyenne de 6 expériences. Les coefficients de variation CV (moyenne des essais sur l'écart type) observés étaient inférieurs à 5%.

4. Résultats et discussion

4.1 Etude de la cristallisation oxalocalcique en l'absence d'inhibiteur

4.1.1 Détermination des concentrations de l'oxalate et du calcium

Pour mieux suivre l'évolution de la cristallisation avec le modèle turbidimétrique mis en place, nous avons déterminé les plages de concentration de chaque espèce cristallisable (oxalate et calcium). En effet, pour des faibles ou de très fortes concentrations, la courbe de la cinétique de cristallisation n'est plus exploitable. Nous avons alors pris en considération les paramètres qui permettent de mieux piloter cette cinétique:

- la différence d'absorbance ΔA qui correspond à l'intervalle de temps compris entre le temps ($t=0$) où la solution d'oxalate de sodium est ajoutée à la solution de chlorure de calcium et le temps t relatif à la fin de la croissance et le début d'agrégation.
- la pente turbidimétrique qui varie avec la concentration
- le rapport et le produit molaires.
- Le coefficient de variation CV.

Les différences d'absorbance ΔA , les pentes turbidimétriques et les CV imposent donc le couple de concentration $[Ca^{2+}, C_2O_4^{2-}]$ pour adopter la gamme de concentration correspondant à la meilleure cinétique de cristallisation. Le Tableau I donne l'ensemble des couples de concentrations testées. Il en ressort que seuls les couples des concentrations suivantes exprimées en mmol.L^{-1} $[(Ca^{2+}:2,5);(C_2O_4^{2-}:0,5)]$; $[(Ca^{2+}:5);(C_2O_4^{2-}:1)]$; $[(Ca^{2+}:5);(C_2O_4^{2-}:0,5)]$; $[(Ca^{2+}:2);(C_2O_4^{2-}:0,25)]$ répondent aux critères ci-dessus. Pour notre travail, nous avons retenu le couple de concentration $[(Ca^{2+}:2); (C_2O_4^{2-}:0,25)]$ qui correspond au couple de concentrations physiologiques $[(Ca^{2+}:4); (C_2O_4^{2-}:0,5)]$, pour sa valeur ΔA très reproductible et pour son faible coefficient de variation.

4.1.2 Influence du produit molaire (sursaturation)

L'étude de la cristallisation oxalocalcique est souvent liée à la sursaturation S que l'on peut définir de la manière suivante:

$$S = (Ca^{2+})(C_2O_4^{2-}) \frac{1}{K_s}, \quad (4)$$

où $a(Ca^{2+})$ et $a(C_2O_4^{2-})$ représentent les activités respectives des ions calcium et oxalate et K_s le produit de solubilité de l'oxalate de calcium. A pH, force ionique et température constants les coefficients d'activité ne varient pratiquement pas. Nous pouvons considérer la sursaturation S dans ces conditions comme proportionnelle au produit molaire oxalocalcique:

$$S = K \cdot [Ca^{2+}] \cdot [C_2O_4^{2-}]. \quad (5)$$

Au facteur de proportionnalité près, il s'agit de la

sursaturation initiale. Nous avons étudié la variation de la pente turbidimétrique en fonction du produit molaire initial. Nous avons choisi de travailler avec un rapport molaire constant dans le but de ne pas fausser les résultats. Le Tableau II donne les résultats des pentes turbidimétriques en fonction des produits molaires obtenus pour les différentes concentrations en calcium et oxalate tout en maintenant le rapport molaire constant. La figure 2 montre que la relation entre la pente turbidimétrique et le produit molaire (sursaturation initiale) est quasiment linéaire, confirmant ainsi l'hypothèse de départ.

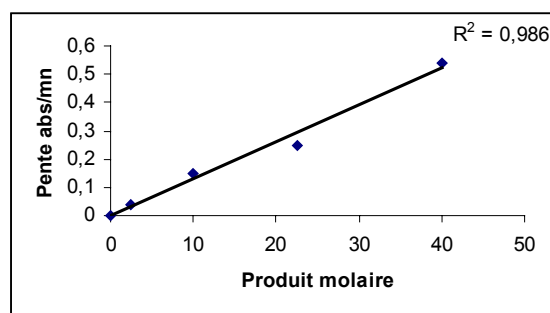


Figure 2 : Influence du produit molaire.

[Ca ²⁺]	[C ₂ O ₄ ²⁻]	ΔA	PENTE	RAPPORT MOLAIRE	PRODUIT MOLAIRE	(% CV)
20	2	0,45	0,540	10	160	11
20	1,5	0,32	0,209	13,3	120	5
20	1	0,22	0,11	20	80	7
20	0,5	0,16	0,042	40	40	10
15	2	0,45	0,374	7,5	120	9
15	1,5	0,34	0,221	10	90	7
15	1	0,22	0,11	15	60	6
15	0,5	0,12	0,036	30	30	9
10	2	0,4	0,339	5	80	4
10	1,5	0,31	0,221	6,7	60	4
10	1	0,24	0,15	10	40	5
10	0,5	0,14	0,037	20	20	4
5	2	0,39	0,45	2,5	40	14
5	1,5	0,28	0,203	3,3	30	6
5	1	0,20	0,15	5	20	1
2,5	0,5	0,12	0,037	10	10	3
2,5	2	0,35	0,193	1,25	20	9
2,5	1,5	0,20	0,074	1,7	15	12
2,5	1	0,15	0,041	2,5	10	16
2,5	0,5	0,047	0,007	5	5	0
2	0,25	0,19	0,108	2	8	3

Tableau I : Evolution des résultats turbidimétriques.

4.1.3 Influence du rapport molaire (poids des constituants)

Pour évaluer le poids relatif des constituants en ions oxalate et calcium vis-à-vis de la cristallisation oxalocalcique, nous avons étudié la variation de la pente turbidimétrique en fonction du rapport molaire. En effet, certains auteurs [6,7] ont montré que le calcium et l'oxalate n'ont pas le même poids lorsqu'il s'agit de la cristallisation oxalocalcique et que l'oxalate même en faible quantité reste le constituant qui entraîne les plus

grandes conséquences. Les résultats obtenus de la variation de la pente turbidimétrique en fonction du rapport molaire donnés dans le Tableau III et la figure 3 montre une valeur de la pente plus élevée lorsque la concentration initiale en oxalate augmente et une diminution du temps d'induction. Ceci montre qu'une même variation de la concentration entraîne des conséquences plus importantes dans le cas de l'oxalate que dans celui du calcium.

[Ca ²⁺]	[C ₂ O ₄ ²⁻]	Produit molaire	Rapport molaire	Pente
5	0,5	2,5	10	0,037
10	1	10	10	0,150
15	1,5	22,5	10	0,221
20	2	40	10	0,540
2	0,25	0,5	8	0,108
2,5	0,5	1,25	5	0,007
5	1	5	5	0,150
10	2	20	5	0,339

Tableau II: influence du produit molaire sur les pentes turbidimétriques.

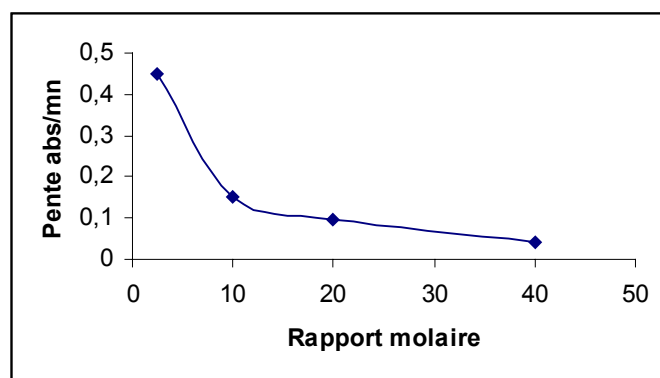


Figure 3: Influence du rapport molaire.

Après avoir déterminé les concentrations de calcium et d'oxalate qui répondent au mieux au modèle retenu, mis en évidence la sursaturation initiale égale à un facteur près, au produit molaire oxalocalcique et montré l'influence du poids de l'oxalate, nous avons entrepris l'étude proprement dite de la cristallisation en présence d'inhibiteur.

4.2 Etude de la cristallisation oxalocalcique en présence d'inhibiteur

Nous avons testé plusieurs substances en utilisant le modèle turbidimétrique qui présente une sensibilité et une fiabilité assez importantes.

Notre choix s'est porté sur l'acide citrique pour être l'inhibiteur le plus étudié dans d'autres modèles [8-10], l'ion magnésium pour son action inhibitrice vis-à-vis du phosphate de calcium, les ions fluorure et ferreux connus pour leur affinité respective au calcium et à l'oxalate. Pour tous les inhibiteurs étudiés nous avons travaillé avec les concentrations physiologiques correspondantes.

4.2.1 Etude de Mg⁺⁺

Les essais en présence de Mg⁺⁺ ont été menés pour des concentrations couvrant la gamme de 0,25 à 7 mmol.L⁻¹. L'ion Mg²⁺ est connu comme

un inhibiteur de la cristallisation phosphocalcique mais l'est beaucoup moins lorsqu'il s'agit de l'oxalate de calcium. Il a été montré que cette inhibition n'existerait que pour des concentrations supérieures à 5 mmol.L⁻¹ en ions calcium [11-14]. Les résultats obtenus pour cette étude représentés dans le Tableau IV et la figure 4 montrent que l'inhibition augmente avec la concentration en magnésium; elle représente 18,85% pour une concentration minimale de 0,25 mmol.L⁻¹ et atteint

94,5% pour une concentration maximale de 7 mmol.L⁻¹.

Le temps d'induction (Ti) augmente aussi avec la concentration suggérant que le mode d'inhibition est une complexation. Le magnésium agit alors en retardant le processus de cristallisation. Il est un bon inhibiteur de la nucléation et de la croissance cristalline de l'oxalate de calcium. Cette étude est d'ailleurs confirmée dans ce travail par microscopie optique à lumière polarisée.

[Ca ²⁺]	[C ₂ O ₄ ²⁻]	Produit molaire	Rapport molaire	Pente
5	2	10	2,5	0,450
10	1	10	10	0,150
14	07	10	20	0.098
20	0,5	10	40	0,042
2	0,25	0,5	8	0,108
2,5	2	5	1,25	0,193
5	1	5	5	0,150
10	0,5	5	20	0,037

Tableau III: influence du rapport molaire sur les pentes turbidimétriques.

Concentration initiale	Ti (mn)	ΔT (mn)	Pente	R ²	(% CV)	% d'Inhibition
[Ca ²⁺]=4; [C ₂ O ₄ ²⁻]=0,5	0,4	0,7-1,4	0,108	0,99593	3,2	
[Mg ²⁺] = 0,25	0,7	0,7-1,6	0,087	0,99881	3,9	18,8
[Mg ²⁺] = 3	1,6	1,7-2,8	0,057	0,99619	3,5	46,5
[Mg ²⁺] = 6	1,9	2-4	0,028	0,99913	3,8	74,0
[Mg ²⁺] = 7	4	4,5-8,5	0,006	0,99240	2,7	94,5

Tableau IV: Evolution de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de Mg²⁺.

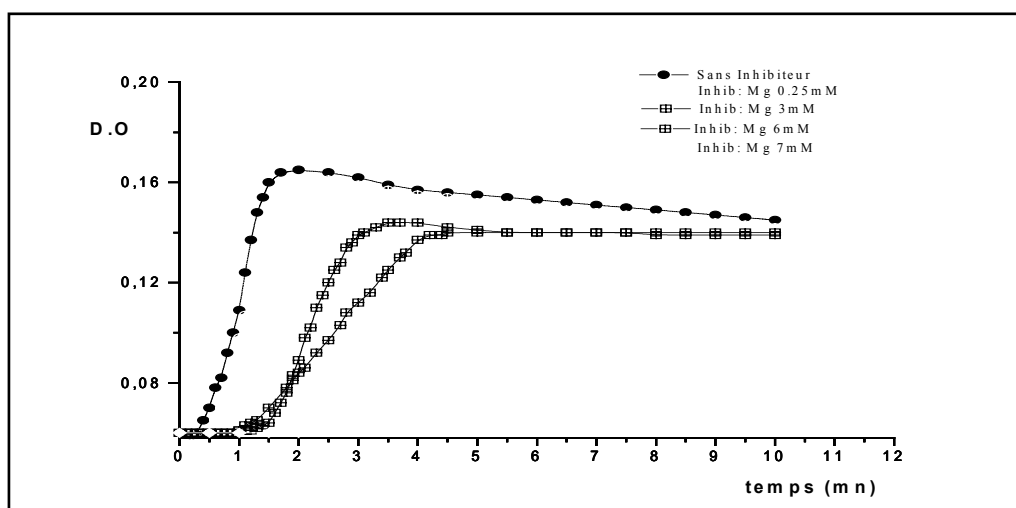


Figure 4: Inhibition par Mg⁺⁺.

4.2.2 Etude de l'acide citrique

La cristallisation oxalocalcique en présence de l'acide citrique a été testée avec des concentrations de 0,25 à 6 mmol.L⁻¹. L'évolution de la cristallisation pour les différentes concentrations de l'acide citrique est donnée dans le Tableau V. La figure 5 représente l'évolution de la cristallisation oxalocalcique en présence de l'acide citrique. L'inhibition par ce dernier à la concentration maximale de 6 mmol.L⁻¹ est très élevée et représente 90,5%. Elle reste significative avec 39,8% même à très faible concentration (2

mmol.L⁻¹). Le temps d'induction augmente aussi avec la concentration de l'acide citrique, ce qui traduit une inhibition par complexation du calcium. Il agit là aussi en retardant la cristallisation par effet surfacique [15,16]. La comparaison avec la littérature reste assez difficile car chaque auteur propose une sursaturation et un rapport molaire différents en dehors des travaux de Hennequin et al. [17] où nous retrouvons les mêmes conditions de sursaturation et un pouvoir inhibiteur de 84% pour une concentration en acide citrique de 6 mmol.L⁻¹.

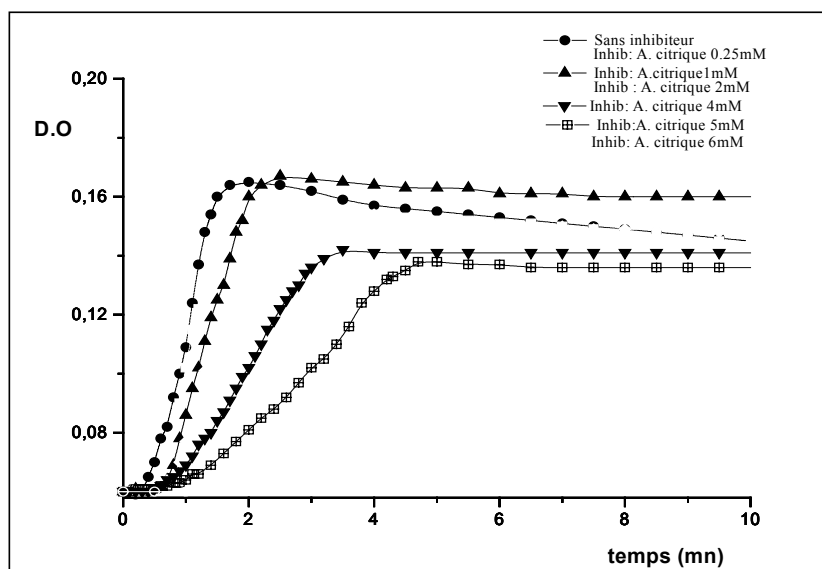


Figure 5: Inhibition par l'acide citrique.

Concentration initiale	Ti (mn)	ΔT (mn)	Pente	R ²	(% CV)	% d'Inhibition
[Ca ²⁺]=4; [C ₂ O ₄ ²⁻]=0,5	0,4	0,7-1,4	0,108	0,99593	3,2	
[acide citrique] = 0,25	0,6	0,7-1,5	0,094	0,99201	2,14	13,4
[acide citrique] = 1	0,8	0,8-1,9	0,076	0,99832	3,05	30,0
[acide citrique] = 2	0,9	0,9-2	0,065	0,99369	4,08	39,8
[acide citrique] = 4	1,1	1,4-2,9	0,036	0,99990	2,84	66,6
[acide citrique] = 5	1,3	1,5-4,2	0,023	0,99613	5,05	79,1
[acide citrique] = 6	1,9	2,1-7,0	0,010	0,99934	2,2	90,5

Tableau V: Evolution de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de l'acide citrique.

4.2.3 Etude de l'ion fluorure

L'inhibition par le fluorure a été étudiée avec des concentrations en fluorure allant de 1 à 12 mmol.L⁻¹. Le Tableau VI et la figure 6 donnent les résultats correspondant à l'évolution de la

cristallisation en présence de l'ion fluorure. Cette étude montre un domaine d'inhibition assez limité puisque nous remarquons que le % d'inhibition varie de 78,3% à 97,7% pour des concentrations respectives de 1 et 12 mmol.L⁻¹.

Concentration initiale	Ti (mn)	ΔT (mn)	Pente	R ²	(% CV)	% d'Inhibition
[Ca ²⁺]=4; [C ₂ O ₄ ²⁻]=0,5	0,4	0,7-1,4	0,108	0,99593	3,2	
[F ⁻] = 1	1,1	1,3-4,4	0,082	0,99690	2,4	23,6
[F ⁻] = 5	1,5	1,5-4,5	0,054	0,99780	3,1	50
[F ⁻] = 10	1,3	1,7-5,6	0,047	0,99477	3,5	56,1
[F ⁻] = 12	1,7	2,0-7,0	0,028	0,99409	2,9	73,5

Tableau VI: Evolution de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de l'inhibiteur F⁻

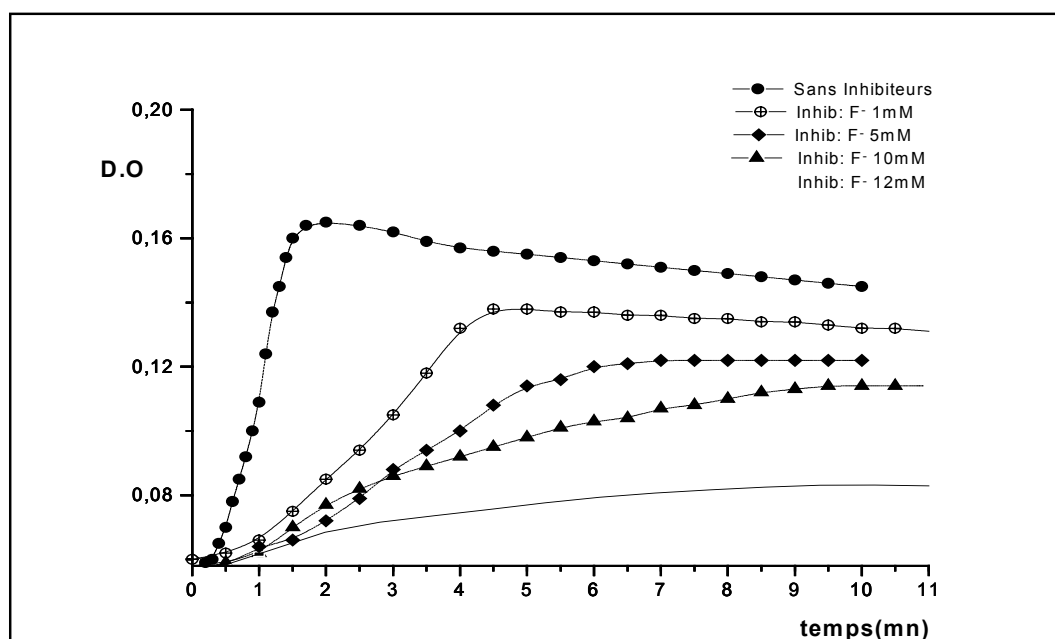


Figure 6: Inhibition par F⁻.

4.2.4 Etude de l'ion ferreux

Trois concentrations ont été retenues pour le test avec l'ion ferreux: 0,1; 0,25 et 0,4 mmol.L⁻¹. Le Tableau VII et la figure 7 donnent les résultats de l'évolution de la cristallisation. L'inhibition de la cristallisation de l'oxalate de calcium est très

importante par les ions ferreux. Elle est efficace dès les plus faibles concentrations. A 0,1 mmol.L⁻¹ le pouvoir inhibiteur est de l'ordre de 95,2%. L'efficacité de l'ion ferreux à agir sur le mode de la nucléation et sur la croissance cristalline reste indiscutable.

Concentration initiale	Ti (mn)	ΔT (mn)	Pente	R ²	(% CV)	% d'Inhibition
[Ca ²⁺]=4; [C ₂ O ₄ ²⁻]=0,5	0,4	0,7-1,4	0,108	0,99593	3,2	
[Fe ²⁺] = 0,1	1,5	1,5-5,5	0,005	0,99296	5	95,2
[Fe ²⁺] = 0,25	3	3,0-7,5	0,003	0,99103	3	97,1
[Fe ²⁺] = 0,4	3,5	3,5-10	0,002	0,99612	2,2	98,3

Tableau VII: Evolution de la cristallisation de l'oxalate de calcium en présence de l'inhibiteur Fe²⁺.

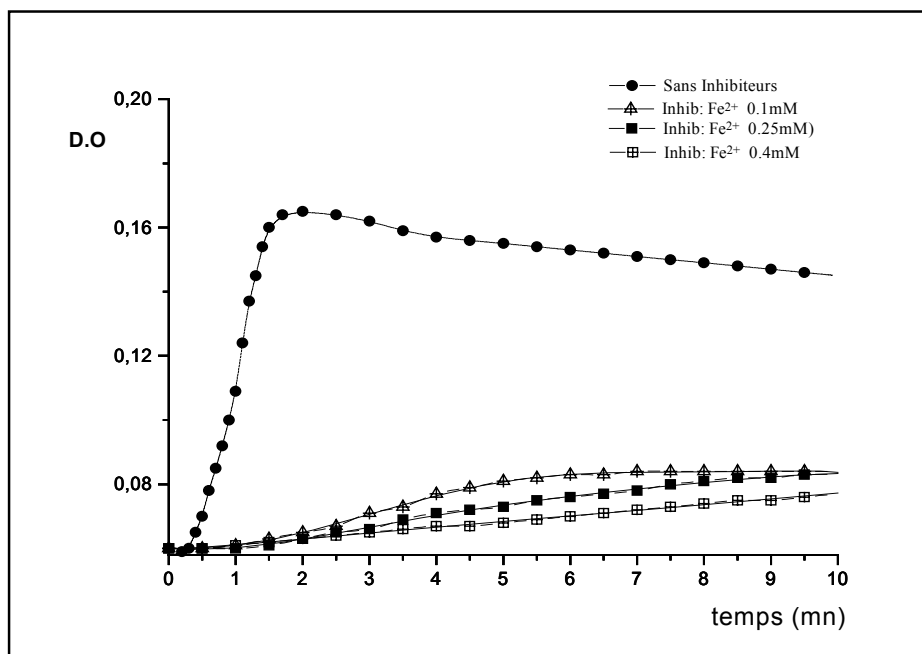


Figure 7: Inhibition par Fe²⁺.

5. Action des inhibiteurs sur les phases de cristallisation

Pour montrer l'action des différents inhibiteurs sur les phases de cristallisation (nucléation, croissance cristalline et agrégation) difficilement mise en évidence par les temps d'induction, nous avons développé une méthode simple de prise de photographies sous microscope optique à lumière polarisée pendant l'étude de la cristallisation avec inhibiteur et sans en fonction de la cinétique de cristallisation.

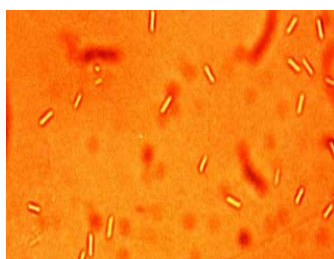
En raison de la faible valeur de l'objectif du microscope utilisé, les concentrations en ions calcium et oxalate testées dans notre étude n'ont pas permis d'avoir des photographies exploitables sur les différentes phases. Nous avons alors déterminé les concentrations minimales en

calcium et oxalate pour lesquelles on devrait s'attendre à des résultats interprétables. Nous avons obtenu 10 et 2 mmol.L⁻¹ respectivement pour Ca²⁺ et C₂O₄²⁻.

Les photographies obtenues en l'absence d'inhibiteur montrent des cristaux d'oxalate de calcium de plus grandes tailles qui tendent à se séparer au cours de la phase de croissance mais qui s'agrègent au bout de 15 minutes. L'examen des photographies (1,2,3) représentant les trois étapes de la cristallisation en l'absence d'inhibiteur et les photographies (4,5,6) en présence de Mg²⁺ montre que cet ion agit plus sur la nucléation (photographie 4) des cristaux de l'oxalate de calcium et l'agrégation (6) que sur la croissance cristalline (photographie 5).

Photographies de la cristallisation en l'absence d'inhibiteurs:

Nucléation



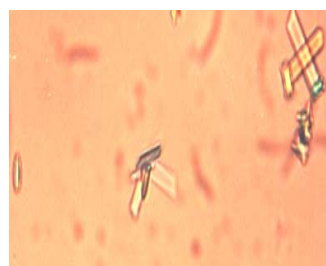
Photographie 1

Croissance cristalline



Photographie 2

Agrégation



Photographie 3

L'inhibition par l'acide citrique se fait sur les trois phases de la cristallisation oxalocalcique aux fortes concentrations. La nucléation, la croissance cristalline et l'agrégation sont totalement inhibée (photographies 7,8,9). Nous remarquons dans cette dernière phase que les cristaux ne s'agrègent pas mais ont tendance à subir une légère croissance. Pour des faibles concentrations, on note un peu plus de cristaux et les étapes sont inhibées dans l'ordre suivant: la nucléation (photographie 7), l'agrégation (photographie 9) et enfin la croissance cristalline (photographie 8).

Si nous comparons la phase de nucléation pour les deux concentrations en acide citrique (4 et 0,1 mmol.L⁻¹), nous remarquerions que pour 4 mmol.L⁻¹, il n'y a aucun cristal sur la photographie, alors qu'à 0,1 mmol.L⁻¹, il y a apparition d'un grand nombre de petits germes d'oxalate de calcium (photographie 10) qui restent dans le même état lors de la croissance cristalline

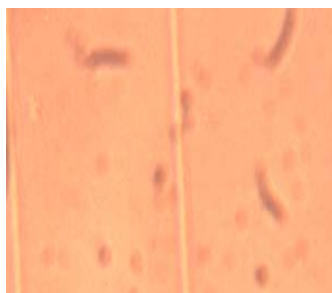
(photographie 11) alors que les agrégats ne se forment pas (photographie 12).

Le fluorure à forte concentration (10 mmol.L⁻¹) agit sur la phase de nucléation (photographie 13) et sur la croissance cristalline (photographie 14). Nous remarquons dans les deux cas, un nombre très important de petits germes mais qui ne subissent aucune croissance. La phase de l'agrégation est moyennement inhibée (photographie 15). En travaillant à faible concentration en fluorure (2 mmol.L⁻¹), il y a confirmation des observations précédentes. En effet, la nucléation est inhibée (photographie 16) de la même façon qu'avec une forte concentration (10 mmol.L⁻¹) mais la croissance cristalline avec la présence d'agrégats et plusieurs cristaux d'oxalate de calcium (photographie 17) est peu inhibée à la suite de la faible concentration en fluorure. Nous constatons aussi qu'à cette concentration, la phase d'agrégation est très peu affectée (photographie 18).

Photographies de la cristallisation en présence de l'inhibiteur : acide citrique

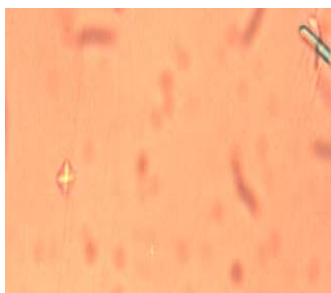
Fortes concentrations en acide citrique 4 mmol.L⁻¹:

Nucléation



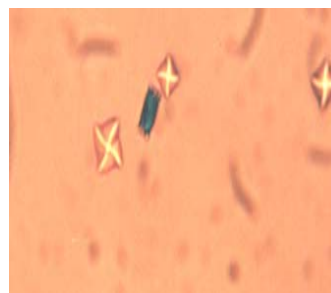
Photographie 7

Croissance cristalline



Photographie 8

Agrégation

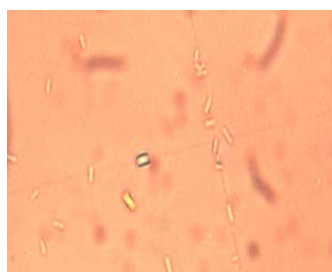


Photographie 9

Faibles concentrations en acide citrique

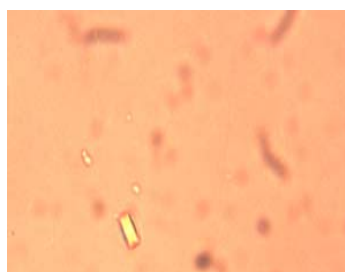
0,1 mmol.L⁻¹:

Nucléation



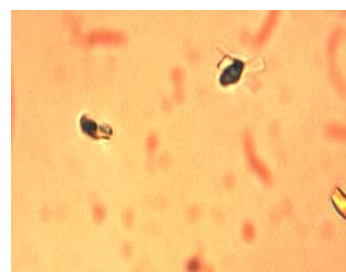
Photographie 10

Croissance cristalline



Photographie 11

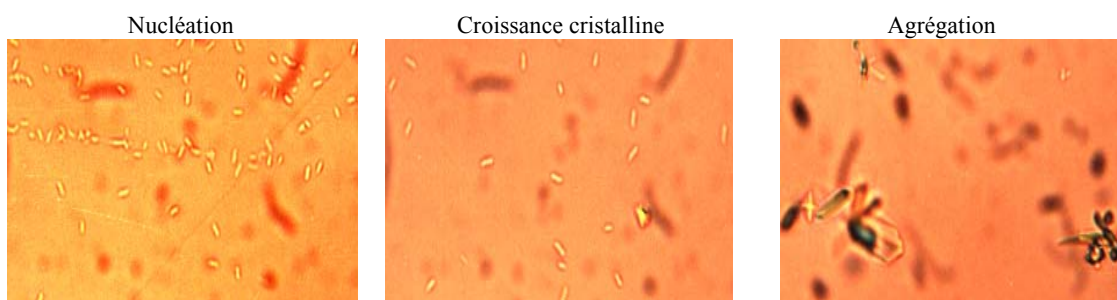
Agrégation



Photographie 12

Photographies de la cristallisation en présence de l'inhibiteur: fluorure

Fortes concentrations en fluorure 10 mmol.L⁻¹:



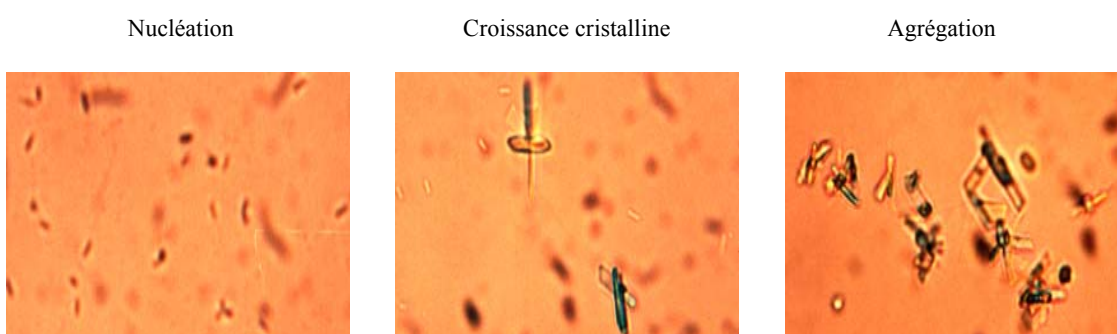
Photographie 13

Photographie 14

Photographie 15

Faibles concentrations en fluorure

2 mmol.L⁻¹:



Photographie 16

Photographie 17

Photographie 18

6. Conclusion

Le modèle turbidimétrique utilisé pour l'étude de la cinétique de cristallisation de l'oxalate de calcium en présence des inhibiteurs est simple à mettre en œuvre, sensible et reproductible. L'effet inhibiteur des substances chimiques testées a été mis en évidence sur les différentes phases de cristallisation et les résultats, à l'échelle d'observation utilisée, ont montré que:

- L'ion magnésium agissait sur la nucléation et l'agrégation.
- L'acide citrique agissait sur la nucléation, la croissance et l'agrégation.
- L'ion fluorure et l'ion ferreux inhibait la nucléation et la croissance cristalline.

Une analyse en microscopie électronique à balayage serait davantage nécessaire pour mieux juger des effets sur les trois phases de cristallisation.

Références

[1] G. Brien, G. Schubert, C. Bick, Eur. Urol.,

1982; 8: 251-256.

[2] M. Daudon, R. Donsimoni, C. Hennequin, S. Fellahi, G. Le Moël, M. Paris, S. Troupel, B. Lacour, Urol. Res., 1995; 23: 319-326.

[3] A. Hesse, H. J. Schneider, S. Schroder, R. Wegler, Zschr. Urol. Nephrol., 1976; 69: 1-9.

[4] R. Boistelle, J. Crosnier, J. L. Funck-Brentano, J. F. Bach, J. P. Grünfeld, Flammarion Medecine-Sciences, 1985, 159-202.

[5] J. P. Kavanagh, C. L. Jones, P. N. Rao, Proceedings of the 7th European Symposium on urolithiasis. Paris, France, May 1997, 150.

[6] Y. Berland, M. Olmer, R. Boistelle, A. Barlatier, Néphrologie, 1984; 5:175-179.

[7] H. G. Tiselius, In: P. O. Schwillie, L. H. Smith, W. G. Robertson, W. Vahlensieck. Urolithiasis and related clinical research. New York, Plenum Press, 1985, 895-898.

[8] J. L. Meyer, W. C. Thomas, J. Urol., 1982; 128: 1376-1378.

[9] C. Minero, P. Maggioroti, M. Barbeni, E. Pelizzetti, G. Tizzani, G. Casetta, P. Piana, C. Giona, Contrib Nephrol, 1987; 58: 65-72

- [10] S. Minisola, W. Rossi, M. T. Patti, L. Scarnecchia, F. Bigi, V. Carnevale, G. Mazzuoli, *Miner Electrolyte Metab.*, 1989; 15: 303-308.
- [11] H. Fleish, *Kidney Int*, 1978; 13:361-371.
- [12] J. L. Meyer, L. H. Smith, *Invest. Urol.*, 1975, 13: 36-39.
- [13] R. L. Ryall, R. M. Harnet, V. R. Marshal, *Clin. Chim. Acta*, 1981,112: 349-356.
- [14] N. K. Li, N. J. Blacklock, J. Garside, *J. Urol.*, 1985; 133: 123-125.
- [15] F. Grases, A. Br. Costa-Bauza, *J. Urol.*, 1990; 66:240-244.
- [16] F. Grases, J. J. Gill, A. Conte, *Urol. Res.*, 1989; 17: 163-166.
- [17] C. Hennequin, V. Lalanne, M. Daudon, B. Lacour, T. Druke, *Urol. Res.*, 1993;1:101-108.