

Activité anti-lithiasique des extraits aqueux des fruits de l'Arbutus Unedo et de l'amande de Zizyphus Lotus

Latifa Baddade¹⁻², Mohamed Berkani¹, Mustapha Oubenali², Abdelkader Ben Ali³, and Mohamed Mbarki²

¹Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Spectroscopie Appliqué et Chimie, Béni Mellal, Maroc

²Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire des Procédés Chimiques et Matériaux Appliqués, Béni Mellal, Maroc

³Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Laboratoire de Chimie du Solide Appliquée, Rabat, Maroc

Copyright © 2019 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 Morocco, some so called "forgotten fruits" such as the "Zizyphus Lotus" fruits and the "Arbutus Unedo" fruits can be valorized in the context of regional sustainable development as local products. In addition, there is a rapidly increasing prevalence of the urolithiasis in the world. The Urolithiasis involves the formation of crystalline aggregates called "urinary stones" that are developed in the urinary tract, usually in the kidneys or ureters, but may also affect the bladder or urethra. The aim of this study is to evaluate the in vitro anti-lithiasic activity of selected "forgotten fruits". The anti-lithiasic activity was evaluated against the aggregation of calcium oxalate. "Zizyphus Lotus" - and "Arbutus Unedo" fruits samples were taken from six zones from Beni Mellal-Khenifra region. The seed of the two fruits species were subjected to a grinding mortar. The samples have been subsequently, submitted a cold maceration using distilled water during 48 hours. The study of the crystallization of calcium oxalate has been carried out by the polarizing optical microscope (PLM). Some aqueous extracts have an anti-crystallization effect on the aqueous solution of the studied lithogenous species.

KEYWORDS: Urolithiasis, calcium oxalate, crystallization, PLM, valorization, Zizyphus Lotus, Arbutus Unedo, anti-lithiasic activity.

RÉSUMÉ: Au Maroc, des fruits dits oubliés comme dans les cas des fruits de jujubier (Zizyphus Lotus) et de l'Arbutus Unedo peuvent être valorisés dans le cadre du développement durable régional en tant que produits locaux. En outre, la prévalence d'urolithiase dans le monde augmente rapidement. L'urolithiase consiste à former des agrégats cristallins appelés « calculs urinaires » développés dans l'appareil urinaire, habituellement dans les reins ou les uretères, mais peuvent également affecter la vessie ou l'urètre. L'objectif du présent travail est d'évaluer l'effet anti-cristallisant, in vitro, des "fruits oubliés" de choix vis-à-vis de la formation de l'oxalate de calcium. Les échantillons de fruits de Z. Lotus et d'A. Unedo ont été prélevés dans six zones de la région de Béni Mellal-Khenifra. Les échantillons de l'amande de Z. Lotus et de fruit de l'A. Unedo ont été broyés à l'aide d'un mortier de façon à avoir une poudre fine pour l'amande de Z. Lotus et une purée pour le fruit de l'A. Unedo. En suite les échantillons ont été soumis à une macération à froid par l'utilisation de l'eau distillée pendant 48 heures. L'étude de la cristallisation, in vitro, de l'oxalate de calcium a été réalisée grâce au microscope optique à lumière polarisée (MOLP). Certains extraits aqueux présentent un effet anti-lithiasique sur la solution aqueuse de l'espèce lithogène étudiée.

MOTS-CLEFS: Urolithiase, oxalate de calcium, cristallisation, MOLP, valorisation, Zizyphus Lotus, Arbutus Unedo, activité anti-lithiasique.

1 INTRODUCTION

La prévalence de l'urolithiase augmente de plus en plus dans le monde et l'oxalate de calcium (CaC_2O_4) est le principal constituant de la majorité des calculs urinaires développés dans l'appareil urinaire des patients lithiasique [1]. L'oxalate de calcium peut exister sous trois formes cristallines plus ou moins hydratées et déterminées selon le nombre de molécule d'eau

dans la formule chimique. On distingue l'oxalate de calcium monohydraté $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$: OCM ou Whewellite ; l'oxalate de calcium dihydraté $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: OCD ou Weddellite et l'oxalate de calcium trihydraté $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: OCT [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]. Au Maroc, cette espèce est localisée dans différentes régions, principalement dans des zones semi-arides telles que la région de Béni Mellal – khenifra. *Z. Lotus* est dormant d'octobre à mars et fleurit des plantes matures en mai et juin et produit des fruits en août [4]. 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 [5]. D'ailleurs, des extraits de cette plante possèderaient des activités thérapeutiques : activité anti-ulcère [6] ; activité anti-inflammatoire et analgésique [7] et activité antispasmodique [8]. L'Arbutus Unedo (*Ericaceae*) est parmi les plantes médicinales utilisées pour traiter des maladies cardiovasculaires, le diabète et l'hypertension. En fait, il améliorerait la fonction rénale [9], [10], [11]. L'A. Unedo pourrait être exploité comme conservateur naturel des denrées alimentaires [12]. L'A. Unedo serait riche en antioxydants : les caroténoïdes comme le B-carotène, Violxanthan et Neoxanthine [13] ; les polyphénols tel que le flavonol glycosides et tanins [14]. L'A. unedo a un effet inhibiteur in vitro de l'agrégation des plaquettes humaines [15], [16]. Son extrait aqueux pourrait de prévenir les processus d'oxydations et des inflammatoires grâce aux activités antioxydantes qu'il possèderait [17]. L'extrait aqueux de l'A. Unedo aurait une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, grâce aux constituants suivants : quinones, anthraquinones, anthocyanines, les tannins et les flavonoïdes [18]. La plante médicinale *Arbutus Unedo* possèderait une activité antileishmaniale [19]. Ainsi, le présent travail a pour objectif de chercher l'effet inhibiteur, in vitro, des extraits aqueux de l'amande de *Z. Lotus* et du fruit de l'A. Unedo sur la cristallisation de l'oxalate de calcium en tant qu'espèce lithogène rencontrée dans les calculs des patients atteints d'uro lithiase.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 MATERIEL VEGETAL

Les échantillons des fruits de jujubier (*Zizyphus Lotus*) ont été collectés depuis le mois septembre 2015-2016 dans six zones de la région de Béni Mellal - khenifra : Oulad Ayyad, Oued Zem, Taglaft, El Ksiba, Tagzirt et Béni Mellal. Les fruits ont été d'abord dénoyautés puis l'amande de la graine a été broyée à l'aide d'un mortier afin de conserver les composantes principales de l'amande et pour obtenir une poudre fine qui sert à la préparation des extraits aqueux (figure1). Les fruits de l'A. Unedo ont été collectés de la région Moulay Aissa Ben Driss en avril 2018 et conservés au réfrigérateur. Ils ont été râpés en utilisant le mortier afin d'obtenir une purée qui sert à préparer des extraits aqueux (figure 2).

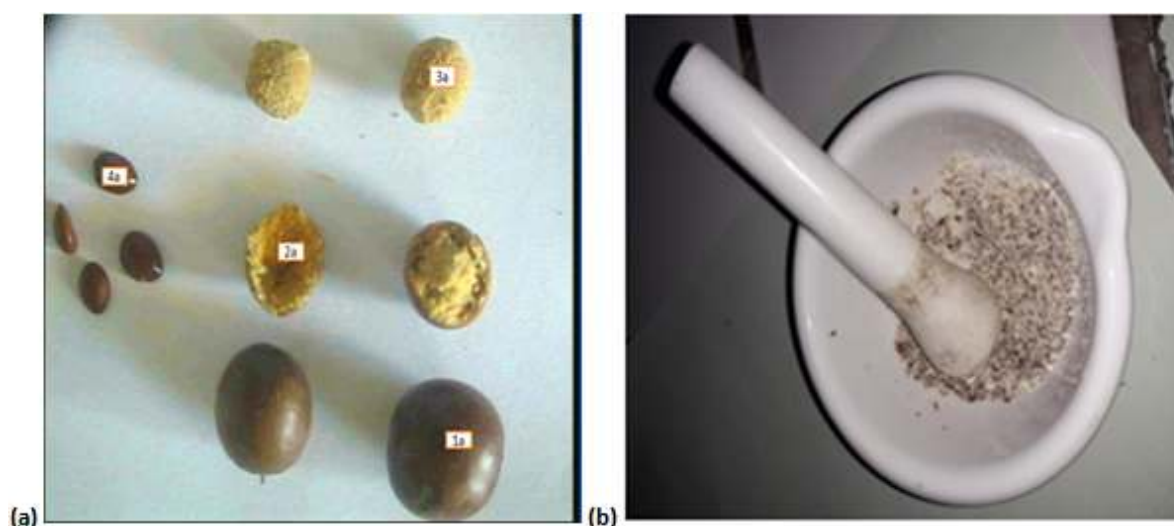


Fig. 1. (a) : Différentes parties de *Zizyphus Lotus* : 1a : le fruit ; 2a : la pulpe ; 3a : le noyau ; 4a : l'amande, (b) : Poudre fine de l'amande de *Zizyphus Lotus*



Fig. 2. (a) : Fruit de l'Arbutus Unedo, (b) : Purée du fruit de l'Arbutus Unedo

2.2 PREPARATION DES EXTRAITS AQUEUX

Les extraits aqueux de l'amande de Z. Lotus et du fruit de l'A. Unedo ont été préparés dans l'eau distillée à des concentrations de 1, 3, 5, 7, 8, et 10 mg/ml. Chaque extrait aqueux a été 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 EN PRESENCE D'EXTRAITS AQUEUX

Le suivi de la cristallisation de l'oxalate de calcium de concentration 10^{-2} mol/l en présence d'extraits aqueux de l'amande de Z. Lotus et du fruit de l'A. Unedo se fait sous agitation en milieu aqueux à pH 6,5 et à une température de 37°C au Bain Marie afin de se rapprocher des conditions physiologiques de l'urine. Les extraits aqueux ont été préparés à des concentrations de 1, 3, 5, 7, 8, et 10mg/ml de la poudre de l'amande de Z. Lotus et de la purée du fruit de l'A. Unedo afin de détecter la concentration minimale correspondant à l'éventuel effet anti-lithiasique de l'espèce lithogène étudiée.

2.4 MICROSCOPE OPTIQUE A LUMIERE POLARISEE

Après 2heures d'agitation de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium en présence d'extraits aqueux, une goutte de cette solution est déposée entre lame et lamelle à l'aide d'une pipette pasteur. La visualisation de l'effet inhibiteur de l'amande de Z. Lotus et du fruit de l'A. Unedo sur la cristallisation de l'oxalate de calcium dans la solution aqueuse selon la teneur croissante des deux fruits de l'étude a été réalisée grâce à un microscope optique à lumière polarisée, marque OLYMPUS (Figure 3).



Fig. 3. microscope optique à lumière polarisée, marque OLYMPUS

La préparation des cristaux de CaC_2O_4 se fait par l'utilisation de deux réactifs : dichlorure de calcium CaCl_2 et l'oxalate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, dans l'eau distillée selon la réaction : $\text{CaCl}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 + x\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O} + 2\text{NH}_4\text{Cl}$; ($x = 1$: whewellite ; $x = 2$: weddellite).

L'indice d'hydratation (x) est évalué par Microscope Optique à Lumière Polarisée. Des résultats d'un travail antérieur réalisé par notre équipe [20] ont montré qu'il y a réduction des agrégats des cristaux de l'oxalate de calcium in vitro en quantité sous l'effet de la dilution par l'eau distillée. Et pour éviter l'effet de la dilution sur les agrégats de l'oxalate de calcium de la solution aqueuse par l'ajout de l'extrait aqueux, nous avons utilisé un même volume aussi bien de l'extrait aqueux des deux fruits de l'étude que de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration 10^{-2}mol/l et en jouant sur la teneur croissante des extraits aqueux. Après trois essais pour chaque concentration de l'extrait aqueux, nous avons mis à la température de 37°C et à pH 6,5 un volume de 10 ml des extraits aqueux de l'amande de Z. Lotus et du fruit de l'A. Unedo et un volume de 10 ml de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration de 10^{-2}mol/l . Après 2 heures d'agitation magnétique nous avons observé sur microscope optique à lumière polarisée à un grossissement de 200 le développement des cristaux de l'oxalate de calcium de la solution aqueuse. Ensuite nous avons modifié la teneur des extraits aqueux de l'amande de Z. Lotus et du fruit de l'A. Unedo afin de pouvoir détecter, éventuellement, la concentration minimale de l'extrait aqueux susceptible d'inhiber la cristallisation de l'oxalate de calcium in vitro.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons trouvé que la concentration optimale de la solution de l'oxalate de calcium qui nous a permis de pouvoir étudier les effets inhibiteurs des différents extraits aqueux est de 5.10^{-3}mol/l . D'ailleurs Deeptiet al [21] ont approché l'effet anti-lithiasique d'extrait aqueux de feuilles d'album de *Chenopodium album* en étudiant la cristallisation in vitro de l'oxalate de calcium. D'après l'étude de Montealegre et al, la dose de 0,5 et de 1 mg/ml de l'extrait de *Blumea Balsamifera* va diminuer la taille du cristal de l'oxalate de calcium, aussi tend à déplacer la phase des cristaux vers la phase d'oxalate de calcium dihydraté (COD) et inhibe l'agrégation des cristaux [22]. Sarsimtha et al [23] ont travaillé sur des extraits aqueux et alcoolique de rhizome de *Bergenia Ciliata* en interpellant leur effet inhibiteur de la nucléation et l'agrégation des cristaux de l'oxalate de calcium. Un travail antérieur a décrit une méthode d'isolement des fractions solubles et insolubles dans le méthanol provenant de *Humulus lupulus L.* riche en composés qui inhibent la formation d'oxalate de calcium. En fait, les deux fractions pourraient être efficaces dans le traitement de la maladie des calculs rénaux [24]. De même, l'effet anti-cristallisant vis-à-vis de l'oxalate de calcium par extrait de la graine de *dolichos biflorus* in vitro a été confirmé [25]. En outre, 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'oxalate de calcium et permettant d'éviter la cristallisation de l'oxalate de calcium en diminuant sa supersaturation [26]. Finalement, les résultats obtenus dans notre travail antérieur déjà publié [20] ont montré que 4 mg/ml de l'extrait aqueux de la poudre de la pulpe de Z. Lotus inhibe l'agrégation de l'oxalate de calcium. A travers le présent travail, 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). Après l'ajout des extraits aqueux et avec la croissance de la teneur des extraits aqueux de l'amande de Z. Lotus et du fruit de l'A. Unedo ; il y a inhibition de la cristallisation de l'oxalate de calcium à partir de la concentration de l'ordre de 3 mg/ml de l'amande de Z. Lotus et du fruit de l'A. Unedo. En présence de 10mg/ml de l'amande de Z. Lotus du fruit de l'A. Unedo ; il y a une dissociation remarquable des agrégats (Figure 5 et 6).

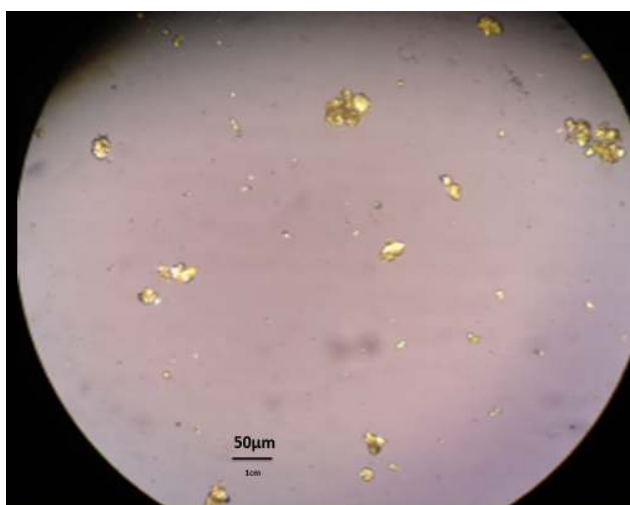


Fig. 4. Micrographie par microscopie optique à lumière polarisée (Grossissement=200) de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration 5.10^{-3}mol/l , en absence d'extrait

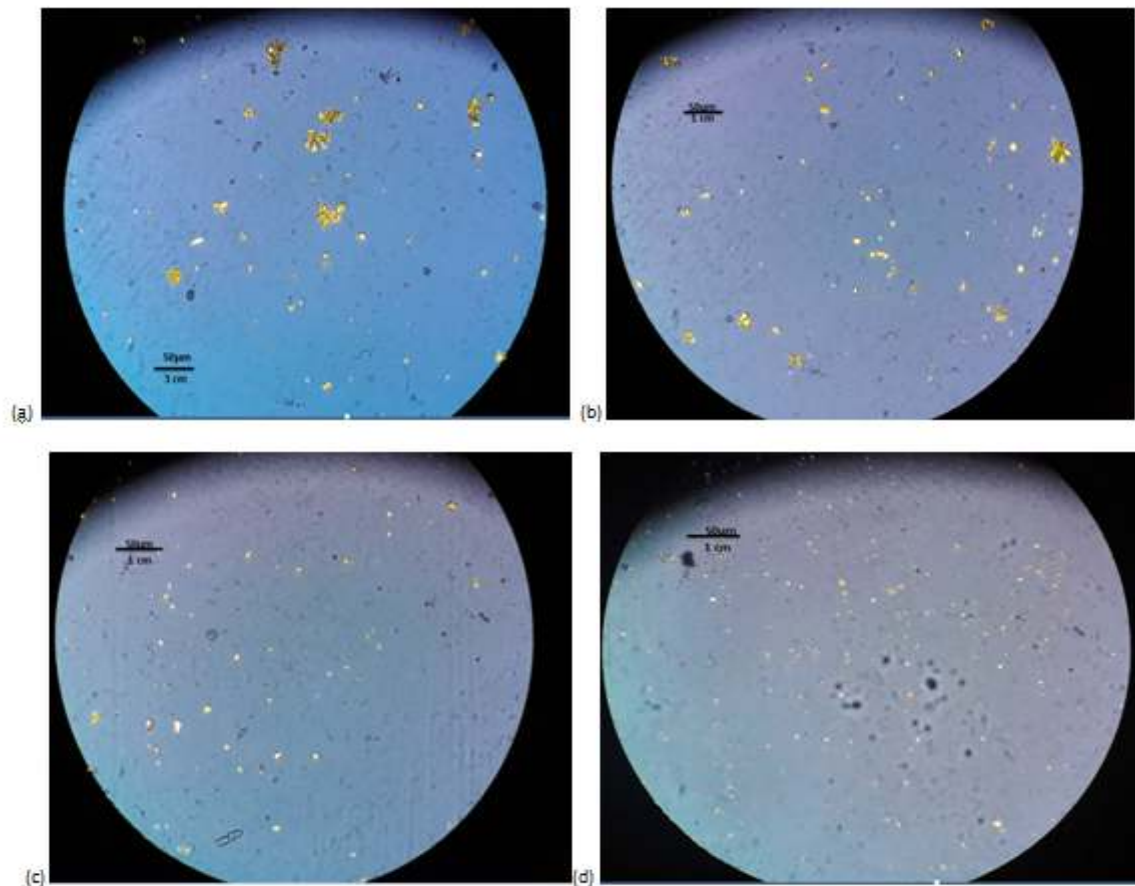


Fig. 5. Micrographie par microscopie optique à lumière polarisée (Grossissement=200) de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration 5.10^{-3} mol/l avec extraits de Zizyphus Lotus : (a) 1 mg/ml de l'extrait aqueux de l'amande de Z. Lotus, (b) 3mg/ml de l'extrait aqueux de l'amande de Z. Lotus, (c) 5mg/ml de l'extrait aqueux de l'amande de Z. Lotus, et (d) 10 mg/ml de l'extrait aqueux de l'amande de Z. Lotus

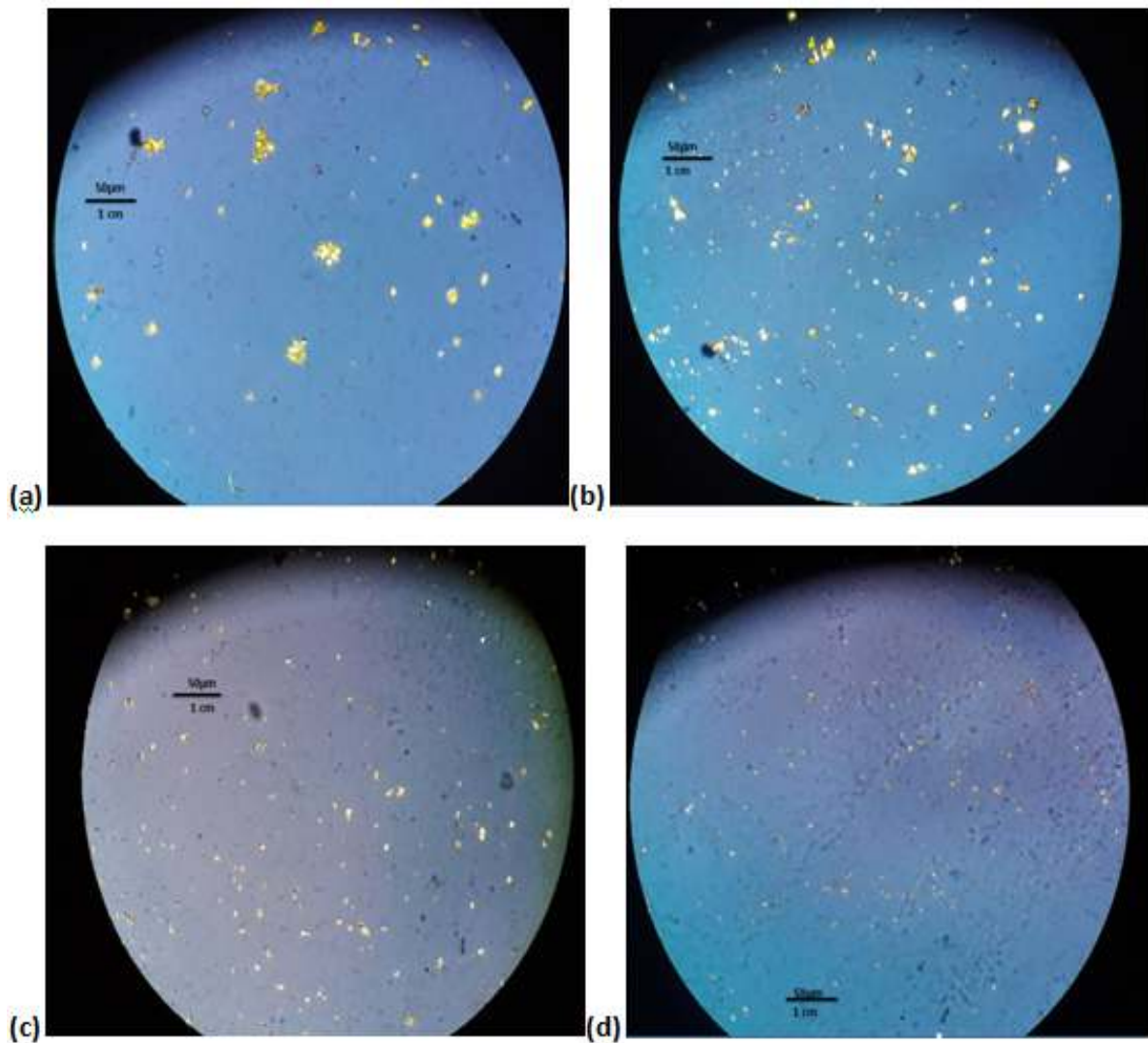


Fig. 6. Micrographie à partir du microscope optique à lumière polarisée (Grossissement=200) de la solution aqueuse de l'oxalate de calcium de concentration 5.10^{-3} mol/l avec extraits de l'Arbutus Unedo : (a) 1 mg/ml de l'extrait aqueux de l'A. Unedo, (b) 3mg/ml de l'extrait aqueux de l'A. Unedo, (c) 5 mg/ml de l'extrait aqueux de l'A. Unedo, et (d) 10 mg/ml de l'extrait aqueux de l'A. Unedo

4 CONCLUSION

Le présent travail a montré que les extraits aqueux de l'amande de Zizyphus Lotus et du fruit de l'Arbutus Unedo présentent un effet inhibiteur de la cristallisation de l'oxalate de calcium in vitro à partir d'une concentration de 3 mg/ml. Le présent travail préconise une étude complémentaire au présent travail sur l'urine humaine afin de pouvoir porter un éclaircissement sur l'urolithiase. En plus, grâce au présent travail la Microscopie Optique en Lumière Polarisée (MOLP), qui est à priori une technique de routine en termes d'analyses dans les laboratoires, pourrait être optimisée et valorisée pour l'étude de la lithogénèse urinaire. L'étude in vivo et les essais cliniques restent déterminants et tranchants dans la question de la valorisation thérapeutique et médicamenteuse de telles plantes le Zizyphus Lotus et l'Arbutus Unedo.

REFERENCES

- [1] A. Trinchierie, "Epidemiology of urolithiasis an update," Clin Cases Miner Bone Metab, vol. 5, no. 2, pp. 101–106, 2008.
- [2] C. Conti, M. Casati, C. Colombo, E. Possenti, M. Realini, G. Diego Gatta, M. Merlini, L. 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] 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.
- [5] Edouard Le Floc'h, 1983. "Contribution à une étude ethnobotanique de la flore de la Tunisie," *Publication Scientifique Tunisiennes*, p.150.
- [6] W. Borgi, A. Bouraoui, and N.Chouchane, "Anti ulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 112, pp. 228–231, 2007.
- [7] W. Borgi, K. Ghedira, and N. Chouchane, "Anti- inflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks," *Fitoterapia*, vol. 78, pp. 16–19, 2007.
- [8] 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.
- [9] H. Jouad, M. Haloui, H. Rhiauani, J. El Hilaly, and M. Eddouks, "Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez- Boulemane)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 77, pp. 175–182, 2001.
- [10] A. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, M. Serhrouchni, and W. Benjelloun, "Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 58, pp. 45–54, 1997.
- [11] S. Afkir, T. B. Nguelefack, M. Aziz, J. Zoheir, G. Cuisinaud, M. Bnouham, H. Mekhfi, A. Legssyer, S. Lahlou, and A. Ziyat, "Arbutus unedo prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats Part I : Cardiovascular and renal hemodynamic effects of Arbutus unedo in L-NAME-induced hypertensive rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 116, pp. 288–295, 2008.
- [12] S. Takwa, C. Caleja, J. C.M. Barreira, M. Soković, L. Achour, L. Barros, and I.C.F.R. Ferreira, "Arbutus unedo L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: a case study using loaf bread," *LWT - Food Science and Technology* (2017), doi: 10.1016/j.lwt.2017.09.041
- [13] R. Delgado-Pelayo, L. Gallardo-Guerrero, and D. Hornero-Méndez, "Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits," *Food Chemistry* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.135>
- [14] A. Pabuçcuoglu, B. Kivçak, M. Bas, and T. Mert, "Antioxydant activity of arbutusunedo leaves," *Fitoterapia*, vol. 74, pp. 597–599, 2003.
- [15] H. Mekhfi, M. El Haouari, A. Legssyer, M. Bnouham, M. aziz, F. Atmani, A. Remmal, and A. Ziyat, "Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 94, pp. 317–322, 2004.
- [16] M. El Haouari, J.J. López, H. Mekhfi, J.A. Rosado, and G.M. Salido, "Anti aggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 113, pp. 325–331, 2007.
- [17] I. Moualek, G.I. Aiche, N.M. Guechaoui, S. Lahcene, and K.Houali, "Antioxydant and anti-inflammatory activities of *Arbutus Unedo* aqueous extract," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 6(11), pp. 937–944, 2016.
- [18] M. El Amin Dib, H. Allali, A. Bendiabdeallah, N. Meliani, and B. Tabti, "Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. ," *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 17, pp. 381–385, 2013.
- [19] A. Bouyahya, A.ET-Touys, N. Dakka, H. Fellah, J. Abrini, and Y. Bakri, "Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco," *Beni- Suf University Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 7, pp. 50–54, 2018.
- [20] L. baddade, M. El Bir, M. Oubenali, M. Echajia, S. Rabi, M. Berkani, and M. Mbarki, "Inhibition de la cristallisation in vitro de l'oxalate de calcium par extrait aqueux de *Zizyphus Lotus*," *International Journal of Innovation and Applied Studies*, vol. 23, no. 4, pp. 583–589, 2018
- [21] 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.
- [22] C.M. Montealegre and R.L. De Leon, "Effet of *Blumeabalsamifera* extract on the phase and morphology of calcium oxalate crystals," *Asian Journal of Urology*, vol. 4, pp. 201–207, 2017.
- [23] S. Sarmistha and R.J. Verma, "Inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by an extract of *Bergeniaceae*," *Arabe Journal of Urology*, vol. 11, pp. 187–192, 2013.
- [24] A. Frackwiak, T. Kozlecki, P. Skibinski, W. Gawel, E. Zaczynska, A. Czarny, K. Piekarrska, and R. Gancarz, "Solubility, inhibition of crystallization and microscopical analysis of calcium oxalate crystals in the presence of fraction from *Humulus lupulus* L.," *Journal of Crystal Growth*, vol. 312, pp. 3525–3532, 2010
- [25] S. Sarmistha and 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.
- [26] A. Rodriguez, A. Costa-Bauza, R.M. Prieto, F. Berga, and F. Grases, "Magnesium, citrate and phytate : Effect binary mixtures as calcium oxalate crystallization inhibitors in urine," *Europeanurology supplements*, vol. 14, pp. 29-78, 2015.