

CALCULS BILIAIRES
Etude physicochimique
de la composante pigmentaire

THESE

POUR LE

DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 7 Juillet 1993

par

Bruno BORDAS

né le 19 Novembre 1964 à Ussel (Corrèze)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur le Professeur J. BUXERAUD PRESIDENT
Monsieur C. MÆSCH, *Maître de Conférences* JUGE
Monsieur le Professeur D. SAUTEREAU JUGE

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN de la faculté : Monsieur le Professeur Claude RABY

ASSESEURS :

Monsieur le Professeur Axel GHESTEM
Monsieur Gilles DREYFUSS, Maître de Conférences

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique - Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie thérapeutique - Chimie organique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François-Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A mes parents,

Qui m'ont offert la possibilité de réaliser mon
ambition,

En remerciement de la confiance et du soutien qu'ils
ont su m'apporter,

Que ce travail soit pour eux la juste récompense de
tous leurs efforts

Avec toute mon affection.

A mes grand-parents,

Qui m'ont activement soutenu et encouragé tout au
long de mes études,

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma
reconnaissance et de mon affection.

A ma soeur, Blandine,

Pour son soutien et sa connaissance de l'anglais.
à sa fille Marine.

A ma famille,

A mes amis et proches,

A Monsieur Vincent DENIS,

Que je remercie tout particulièrement pour sa
patience, sa disponibilité et la qualité de la mise en
page.

**A Monsieur le Professeur Jacques BUXERAUD
Professeur des Universités de Chimie
thérapeutique et Chimie organique**

Vous nous faites l'honneur d'accepter la Présidence
du jury de notre thèse.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profond
respect et notre reconnaissance pour l'enseignement
dynamique que vous nous avez dispensé et les
conseils par lesquels vous avez guidé nos études.

A Monsieur Christian MOESCH
Docteur es Sciences Pharmaceutiques
Maître de Conférences en Chimie Organique

Nous vous sommes reconnaissant d'avoir accepté de diriger ce travail et nous vous remercions pour le concours précieux de votre expérience, votre rigueur scientifique, vos multiples conseils, votre patience et votre totale disponibilité.

C'est en rendant hommage à vos qualités humaines et pédagogiques que nous vous demandons de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude

**A Monsieur le Professeur Denis SAUTEREAU
Professeur des Universités en Hépatologie et en
Gastro-Entérologie.**

Vous avez spontanément accepté de participer au jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de nos vifs remerciements et de notre très respectueuse considération.

PLAN

INTRODUCTION

I. PREMIERE PARTIE: GENERALITES

I. 2. EPIDEMIOLOGIE

I. 2. 1. Repartition géographique

I. 2. 2. La race

I. 2. 3. l'âge

I. 2. 4. Le sexe

I. 2. 5. Régime et poids

I. 2. 6. Pathologie

I. 2. 7. Localisation des calculs

I. 3. ASPECT ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES CALCULS PIGMENTAIRES

I. 3. 1 Les calculs pigmentaires bruns

I. 3. 2. Les calculs pigmentaires noirs

I. 4. COMPOSITION DES CALCULS PIGMENTAIRES ET DE LA BILE

I. 4. 1. Les calculs pigmentaires bruns

I. 4. 2. Les calculs pigmentaires noirs

I. 4. 3. La bile

a - Les éléments minéraux

b - Les éléments organiques

I. 5. PHYSIOPATHOLOGIE

I. 5. 1. La bilirubine

I. 5. 2. Genèse des calculs bruns

a - Rôle de l'infection biliaire

b - Autres facteurs favorisants

c - Cas particuliers des endoprothèses biliaires

I. 5. 3. Genèse des calculs noirs

a - Rôle de l'hyperhémolyse

b - Rôle des sels biliaires

c - Rôle de la mucine

d - Rôle du dioxyde de carbone

e - Formation de polymères

I. 6. IDENTIFICATION ET TRAITEMENTS DES CALCULS PIGMENTAIRES

I. 6. 1. Identification

I. 6. 2. Thérapeutique de dissolution des calculs pigmentaires

I. 6.3. Perspectives d' avenir dans la lutte contre les calculs pigmentaires

I. 7. LES METHODES D' ANALYSE DES CALCULS

I. 7. 1. Techniques chimiques

I. 7. 1. 1. Méthodes qualitatives

I. 7. 1. 2. Méthodes quantitatives

I. 7. 2. Techniques physiques

I. 7. 2. 1. Méthodes fragmentaires

I. 7. 2. 2. Méthodes globales

- a - Techniques radiographiques**
- b - Méthodes optiques**
- c - Méthodes cristallographiques**
- d - Méthodes spectroscopiques**

II. DEUXIEME PARTIE: EXPERIMENTATION

II. 1. SYNTHESSES

II. 1. 1. Matériel et réactifs

II. 1. 2. Principe

II. 1. 3. Synthèse du bilirubinate de calcium neutre

1. 3. 1. Equation de la réaction

1. 3. 2. Synthèse selon EDWARDS

1. 3. 3. Synthèse selon MAKI

1. 3. 4. Synthèse selon SUTOR et WILKIE

II. 1. 4. Synthèse du bilirubinate de calcium acide

II. 1. 5. Synthèse du bilirubinate de calcium intermédiaire

II. 1. 6. Synthèse du polymère de bilirubine

II. 2. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE

II. 2. 1. Matériel et réactifs

II. 2. 2. Méthode

II. 2. 3. Spectres

2. 3. 1. Produits purs

- a - Bilirubine
- b - Bilirubinate de calcium acide
- c - Bilirubinate de calcium neutre
- d - Bilirubinate de calcium intermédiaire
- e - Polymère

2. 3. 2. Mélanges binaires

- a - Mélange bilirubinate de calcium neutre / bilirubine
- b - Mélange bilirubinate de calcium neutre / bilirubinate de calcium acide
- c - Mélange bilirubine / bilirubinate de calcium acide

II. 3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

II. 3. 1. Matériel et réactifs

II. 3. 2. Méthode

II. 3. 3. Résultat

- a - Recherche du solvant d'élution
- b - Chromatographie de la bilirubine et de ses sels

III. TROISIEME PARTIE: DISCUSSION ET APPLICATION

III. 1. DISCUSSION

III.1.1. Limites de l'analyse infrarouge

III.1.2. Etude chromatographique sur couche mince

III.2. APPLICATION

III.2.1. Analyse de calculs biliaires

III.2.2. Analyse d'endoprothèses biliaires

CONCLUSION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

En France, près de trois à quatre millions de personnes ont des calculs biliaires; 100 000 à 200 000 nouveaux cas sont découverts chaque année, et bien souvent cela conduit à une cholécystectomie.

Chaque année, environ 800 000 nouveaux cas sont diagnostiqués aux USA, ce qui fait de cette pathologie l'une des plus importantes de ce pays.

L'importance de cette pathologie tant sur le plan purement médical que sur le plan socio-économique justifie la mise en place d'une politique de prévention.

A ce jour, les données de la littérature indiquent qu'il existe deux grands types de calculs biliaires, à savoir les calculs cholestéroliques, et les calculs pigmentaires.

Dans les pays occidentaux, environ 80% des calculs sont cholestéroliques, purs ou mixtes; les calculs cholestéroliques purs ne contiennent que du cholestérol; les calculs mixtes contiennent au moins 50% de cholestérol associé à des pigments biliaires. On estime que la physiopathologie de ces deux types de calculs est voisine, voir identique.

Environ 20% des calculs sont pigmentaires; ces calculs pigmentaires sont composés principalement de pigments biliaires.

Notre travail consistera en l'étude physico-chimique de la composante pigmentaire. Nous ferons, en premier lieu, le bilan de ce qui a été dit jusqu'à ce jour sur la composition et l'étiopathogénie de ces calculs. Dans une seconde partie, expérimentale, nous nous intéresserons à la composante pigmentaire des calculs que nous synthétiserons. Nous en ferons aussi une analyse physico-chimique précise par spectrophotométrie infrarouge à transformée de FOURIER et par chromatographie sur couche mince. La complémentarité de ces deux méthodes sera montrée pour l'analyse de divers mélanges binaires qui peut soulever dans certains cas quelques difficultés sur le plan qualitatif et par conséquent sur le plan quantitatif.

Enfin dans une dernière partie nous appliquerons les résultats que nous avons obtenus à l'analyse de calculs pigmentaires noirs et bruns ainsi qu'à l'étude de dépôts obstruant les endoprothèses biliaires.

PREMIERE PARTIE:

GENERALITES

I. GENERALITES : LES CALCULS PIGMENTAIRES

I. 1 . LES DIFFERENTES CLASSIFICATIONS

Depuis que l'on parle de calculs biliaires, différents auteurs ont cherché à les classier en se basant principalement sur leur aspect macroscopique et leur composition chimique. Mais on peut aussi se poser la question de savoir où se situe la limite entre le calcul pigmentaire et le calcul cholestérolique sachant par exemple que nombre de calculs cholestéroliques ont un centre d'origine pigmentaire (1) .

Dés 1964, une classification proposée par BOGREN (2) distinguait trois grands types de calculs:

- des calculs homogènes qui seraient principalement composés, soit de cholestérol, soit de pigments biliaires;
- des calculs hétérogènes qui ne sont ni plus ni moins qu'un mélange cholestérol-pigmentaire, mais sur lequel on ne trouve pas de différences entre le centre et la périphérie du calcul;
- les calculs combinés dont le centre et la périphérie sont de compositions différentes.

La classification de MAKI (3) au Japon comporte trois grands types de calculs:

- les calculs à chaîne de cholestérol,
- les calculs à chaîne de bilirubine,
- les calculs non-organiques.

Cet auteur note en plus que parmi les calculs à chaînes de cholestérol, certains pourraient avoir une faible teneur en cholestérol. Parmi ceux à chaîne de bilirubine de calcium on note deux sous types: les calculs à bilirubinate de calcium (sombres et rougeâtres) et les calculs pigmentaires purs, rares au Japon, de localisation vésiculaire et d'apparence noire.

CETTA et coll. (4), classent les calculs pigmentaires en deux groupes: les calculs pigmentaires purs et les calculs mixtes. Dans leur classification, les calculs pigmentaires purs sont séparés en deux sous-groupes: les calculs pigmentaires noirs, et les calculs de sels de calcium de pigments biliaires.

RAJAGOPAL et coll. (5) parlent d'une classification des calculs pigmentaires en distinguant deux groupes: les calculs avec et les calculs sans carbonate de calcium.

Bien qu'il soit difficile de choisir l'une ou l'autre de ces classifications, il apparait que l'on va progressivement vers une classification où l'on pourrait parler de calculs pigmentaires dès lors que ceux-ci contiennent moins de 30% de cholestérol; ces calculs pigmentaires de par leur aspect et leur étiopathogénie se divisent en deux groupes: les calculs bruns (aussi appelés calculs à base de sels

de calcium de pigments biliaires) et les calculs noirs (aussi nommés par certains auteurs calculs pigmentaires purs).

Dans la suite de notre travail, nous adopterons cette dernière classification, même si l'étude de la composition chimique des calculs fera pressentir quelques inexactitudes dans cette classification.

I. 2. EPIDEMIOLOGIE

I. 2. 1. Répartition géographique

On observe que la fréquence des calculs pigmentaires varie beaucoup en fonction des pays considérés:

- Aux Etats Unis, une étude réalisée en 1982, montre qu'une lithiase pigmentaire noire est retrouvée dans 27% des cas de cholécystectomies effectuées dans un grand hôpital (6).

- Au Japon, où l'on classifie les calculs depuis fort longtemps, on a déterminé vers 1975 qu'en milieu rural 70% des calculs sont de type pigmentaire.

- En Irak la prévalence des calculs pigmentaires était de 24% en 1977 (1).

En général il est communément admis que l'on trouve plus facilement des calculs bruns dans les régions de l'Orient.

I. 2. 2. La Race

Il ne semblerait pas y avoir de différence quant à l'incidence des calculs pigmentaires noirs ou bruns selon la race. Il s'agirait plus d'un problème alimentaire et ethnique que de race (1). Au Japon notamment, la forte prévalence des calculs bruns, observée jusque dans les années 70, tend actuellement à disparaître.

On remarque aussi que parmi certains groupes ethniques: Indiens d'Amérique du Nord, Scandinaves, Boliviens... les calculs pigmentaires sont rares (1).

I. 2. 3. L'âge

Avant l'âge de 10 ans, les cas rapportés sont très rares, qu'il s'agisse de calculs pigmentaires ou de calculs cholestéroliques. Puis vers l'âge de 70 ans la lithiase cholestérolique prédomine pour passer ensuite le relais à la lithiase pigmentaire (7).

I. 2. 4. Le sexe

Contrairement à ce qui se passe pour les calculs cholestéroliques, le sexe ne semble pas avoir d'importance pour ce qui est de la prévalence des calculs pigmentaires. Ceci est surtout dû au fait que la formation des calculs pigmentaires n'est pas liée au taux d'hormones sexuelles, même si l'on sait que les hormones femelles peuvent jouer un rôle sur l'état de vacuité de la vésicule biliaire (1).

I. 2. 5. Régime et poids

L'influence du régime alimentaire est encore mal connue, mais il est évident qu'elle existe, puisque la prévalence des calculs

bruns a diminué au Japon en même temps que de nouvelles habitudes alimentaires venaient de l' Ouest. En effet, l'incidence qui est actuellement de 30% était de 70 à 80% dans les années 1945 à 1960 (3) . L'incidence des calculs bruns est donc encore assez élevée pour une majeure partie de la population japonaise; cependant les fermiers et les pêcheurs dont les revenus sont restreints, sont en général épargnés par rapport aux classes plus favorisés.

D'autre part, l'obésité ne jouerait pas de rôle significatif dans la formation des calculs pigmentaires.

I. 2. 6. Pathologie

Les calculs noirs se forment dans la vésicule biliaire et sont communément associés à l'hyperhémolyse chronique d'une part et aux cirrhoses d'autre part (1), bien que la majorité des malades ayant des calculs noirs ne remplissent ni l'une ni l'autre de ces conditions. Des calculs pigmentaires ont été également observés dans d'autres maladies chroniques du foie, comme la cirrhose biliaire primitive.

Les calculs bruns se forment dans les voies biliaires notamment intrahépatiques. Ils sont plus fréquents en Orient qu'en Occident. En Occident on les trouve principalement associés à une sténose des voies biliaires, une anastomose bilio-digestive, un diverticule duodénal, ou une maladie congénitale des voies biliaires, comme une maladie de Caroli.

On les trouve également chez les patients soumis à une nutrition parentérale prolongée.

I. 2. 7. Localisation des calculs (Figure 1)

De manière générale les calculs noirs se forment dans la vésicule biliaire, tandis que les calculs bruns se forment principalement dans les voies biliaires et notamment intra-hépatiques (tableau 1).

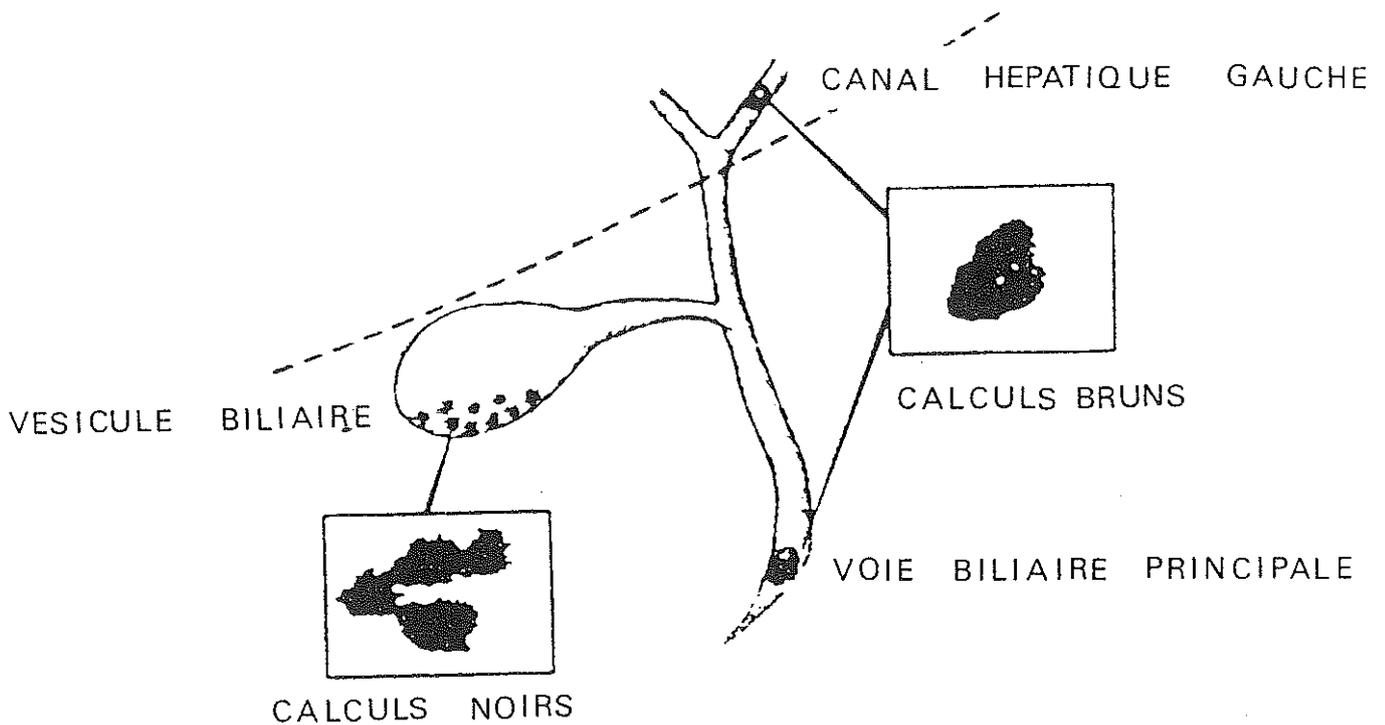


Figure 1: Localisation des calculs dans les voies hépatiques

Tableau 1: Différences entre les calculs noirs et bruns
d'après ERLINGER (8).

	Calculs Noirs	Calculs bruns
Couleur	Noire	Brun-orangé
Aspect	Amorphe	Parfois laminé
Consistance	friable	molle
Localisation	Vésicule	Voies biliaires
Géographie	Occident, Orient	Orient principalement
Culture de bile	Stérile	Infectée
Constituant principal	Polymère de bilirubine	Bilirubinate de calcium

I.3. ASPECT ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES CALCULS PIGMENTAIRES

Les calculs pigmentaires sont souvent multiples, avec une taille variant de 2 à 5 mm de diamètre. La plupart d'entre eux présentent un aspect amorphe sans structure cristalline (2,8).

I. 3. 1. Les calculs pigmentaires bruns (6)

Ces calculs ont une consistance friable ainsi qu'une structure feuilletée, arrangée en couches concentriques. Cette structure est relativement homogène et il est difficile d'observer un noyau de structure et de nature différente (4).

On observe ainsi des micropores, voire de grosses cavités au centre du calcul (9), qui semblent évoquer un processus de déshydratation lors de la solidification des calculs. La densité au centre n'est d'ailleurs pas très élevée. La structure est beaucoup plus ordonnée à la périphérie où les cavités sont absentes.

Ces calculs sont radiotransparents et en lumière polarisée on peut voir des cristaux de sels d'acides gras situés entre des couches composées de pigments biliaires (10).

I. 3. 2. Les calculs noirs (6)

Ils sont de forme irrégulière et de consistance friable. Leur aspect externe est noir tandis que leur intérieur est de couleur brune. Ici encore on observe des micropores (9) plus prononcés que dans les calculs bruns, mais dans ce cas le centre est homogène.

On distinguera ici des calculs radiotransparents et des calculs radiopaques.

I.4. COMPOSITION DES CALCULS PIGMENTAIRES ET DE LA BILE

Les américains, grâce à de nombreuses analyses par des méthodes chimiques, chromatographiques ou spectrales, ont cernés la composition de ces calculs. Ces études sont encore poursuivies à ce jour et nous en rapportons les principaux résultats.

Les calculs sont majoritairement composés de bilirubine et de ses dérivés. Ils comportent par ailleurs une matrice glycoprotéique représentant moins de 10% du produit sec.

Le bilirubinate de calcium, constituant commun des deux types de calculs, semble jouer un rôle primordial dans la formation des calculs pigmentaires (11). C'est la raison pour laquelle ce bilirubinate de calcium a été souvent synthétisé "in vitro" notamment par EDWARDS (11), MAKI (12) ou SUTOR et WILKIE (13).

En l'occurrence, SUTOR et WILKIE ont montré qu'ils ont pu obtenir "in vitro" trois formes monohydratées de bilirubinate de calcium.

- Un sel acide associant deux molécules de bilirubine à un atome de calcium et de formule brute $(C_{33}H_{35}N_4O_6)_2Ca, H_2O$.

- Un sel neutre où tous les groupements acides de la bilirubine sont salifiés et dont la formule est la suivante: $C_{33}H_{34}N_4O_6Ca, H_2O$.

Un sel intermédiaire de formule stoechiométrique associant une molécule et demie de bilirubine pour un atome de calcium: $(C_{33}H_{35}N_4O_6)_{1,5}Ca, H_2O$.

I. 4. 1. Les calculs pigmentaires bruns (2, 6, 8)

Nous retrouverons les composés suivants:

- Le bilirubinate de calcium sous les trois formes: sel acide, sel neutre et sel intermédiaire.

- Les acides gras: sous forme de sels de calcium, rarement sous forme libre (14). Ils sont dérivés des lécithines biliaires. L'analyse chimique, la spectroscopie infrarouge, la chromatographie en phase gazeuse montrent que l'acide gras majoritaire est l'acide palmitique (10) souvent rencontré sous forme de palmitate de calcium (14).

- Les mucopolysaccharides; l'examen histochimique des calculs bruns a révélé la présence d'un réseau diffus de mucopolysaccharides acides contenant des radicaux sulfurés. On a pu noter la présence ubiquitaire de ces mucopolysaccharides entre les cristaux de sels de calcium d'acides gras. Ceci laisse supposer que ces mucopolysaccharides joueraient un rôle important pour la cohésion entre les cristaux et les particules pigmentaires (10).

- Le cholestérol: il n'est retrouvé qu'en très faible quantité (4), inclus dans une matrice glycoprotéique.

- Les phosphates et les carbonates sont rares mais on note une quantité importante de cations métalliques.

- Le calcium se trouve généralement à des taux inférieurs à 4%.

I. 4. 2. Les calculs noirs (2, 6, 8)

Comme nous l'avons vu plus haut, on distingue des calculs radiotransparents et des calculs radio-opaques:

- Les premiers ont une teneur en calcium d'environ 2% ; ils sont composés à plus de 80% de pigments tétrapyrroliques dégénérés,

dérivés de la bilirubine ou du bilirubinate. Cette dégénérescence impliquerait aussi bien une polymérisation qu'une réduction bactérienne qui conduiraient à des produits plus ou moins polymérisés, liés à une dégradation de pigments biliaires à haut poids moléculaire (15).

- Les calculs radio-opaques contiennent plus de 10% de calcium. Leur composition est semblable à celle des calculs radiotransparents mais avec un taux de phosphates et/ou de carbonates de calcium plus important. On peut noter que 65% des calculs radio-opaques sont calcifiés par des phosphates de calcium (15).

La différence qualitative majeure entre calculs pigmentaires noirs et bruns vient du fait que pour les calculs pigmentaires noirs, la composante pigmentaire peut se trouver à un degré de polymérisation relativement élevé contrairement aux calculs bruns. La formation des pigments noirs est due à la polymérisation d'un dérivé dipyrrolique considéré soit comme un des catabolites de la dégradation physiologique de l'hémoglobine, soit comme un anabolite de la biosynthèse de l'hème. Ces hypothèses sont fort discutées à ce jour car non prouvées (15).

Indifféremment dans les deux types de calculs noirs nous retrouverons les composants suivants:

- Les polymères de bilirubine

- Les sels de calcium d'acides organiques: nous y trouvons le bilirubinate de calcium qui est le composant majoritaire, mais aussi le palmitate de calcium qui n'est rencontré qu'en faible quantité, et à une teneur identique à l'intérieur et à l'extérieur du calcul (5).

- Des sels minéraux: le calcium est l'élément le plus fréquemment rencontré dans les calculs pigmentaires. Le carbonate de calcium a été caractérisé par diffraction des rayons X sous forme de vaterite, d'aragonite et de calcite (13). Le carbonate de calcium se situe principalement à la périphérie des calculs sous forme de bandes étroitement liées au bilirubinate de calcium (9). Les phosphates de calcium sont principalement la carbapatite, la brushite et le phosphate amorphe; parfois calcium et magnésium sont associés et constituent la whitlockite (15).

- Les glycoprotéines muqueuses constituent la matrice du calcul et sont vraisemblablement sécrétées par l'arbre biliaire. Elles sont invariablement présentes.

- Les autres éléments minéraux que l'on retrouve à des taux significatifs et de matière constante dans les calculs noirs sont: le sodium, le calcium, le magnésium(5,15). Mais on peut aussi

trouver sous forme de traces, du potassium, du cobalt, du nickel, du fer et de l'argent (5).

La présence de cuivre pourrait être due à la précipitation de ses ligands protéiques, tels l'albumine (5). Quant au fer, sa présence pourrait être liée à une hémorragie de la paroi de la vésicule biliaire.

Enfin on note parfois la présence de chlorure de sodium qui pourrait bien exister dès le début de la formation du calcul (5).

En conclusion, comme le montre le tableau 2, le bilirubinate de calcium pourrait bien ne pas être le principal composant du calcul. Le spectre infrarouge des calculs n'est pas suffisamment typique pour affirmer que le bilirubinate de calcium est à un taux aussi élevé que dans les calculs bruns (16). Les calculs noirs seraient plutôt composés de polymères de bilirubine et de ses dérivés, liés à des composés complexes, comportant du cuivre ou du fer. Ces pigments pourraient donc bien être des complexes métal-bilirubine, par exemple un bilirubinate double de calcium et de cuivre (1). Le calcium pour sa part pourrait également être lié à un phosphate ou à un carbonate (16).

Tableau 2: Différence de composition entre les calculs pigmentaires noirs et bruns d'après TROTMANN et OSTROW (6, 17).

COMPOSANT	CALCUL NOIR	CALCUL BRUN
Pigment total biliaire	Polymères insolubles 40%	Bilirubinate de Calcium 50% à 60%
Calcium total	15%	5%
Sels de calcium:		
- Carbonates	6 à 13%	néant
- Phosphates	5 à 9%	Inf. à 1%
-Palmitates	1%	9 à 15%
Cholestérol non estérifié	2 à 3%	15 à 23%
Sels biliaires	2%	2%
Résidu non mesuré	24%	12%

I. 4. 3. La bile (18, 19)

Les compositions de la bile vésiculaire et de la bile hépatique diffèrent considérablement. L'eau et les électrolytes sont absorbés dans la vésicule et la bile vésiculaire ($d=0,99$ à $1,01$; % de matières sèches 85 à 136 g/l; viscosité relative 2,85) est plus concentrée que la bile hépatique ($d=0,99$ à $1,01$; % de matières sèches 20 à 34 g/l; viscosité relative 1,27).

La bile est à peu près isotonique avec le sérum. L'osmolalité de la bile vésiculaire ne change pas de façon significative en fonction de l'apport de bile hépatique dans la vésicule biliaire puisque les sels de sodium des acides biliaires forment des micelles osmotiquement inactives (coefficient osmotique 0,45) (18).

Le pH de la bile vésiculaire ($pH=6,9$) est plus faible que celui de la bile hépatique ($pH=7,1$). Ceci est probablement dû à une sécrétion intra-vésiculaire d'ions H^+ .

La bile circulant au contact des calculs pigmentaires n'est habituellement pas saturée en cholestérol et peut contenir une proportion élevée de bilirubine $IX\alpha$, libre ou monoconjuguée (8). Elle comporte également de nombreuses et fines particules de bilirubinate de calcium qui peuvent être identifiés au microscope (3) et qui lui confèrent une consistance épaisse.

a - Les éléments minéraux (tableau 3)

1. Le calcium: La concentration en calcium ionisé dans la bile est de 0,75 à 1,0 mM. Il semble bien possible que cette concentration soit liée au pH, aux sels biliaires mais aussi aux glycoprotéines pour lesquelles les pigments biliaires joueraient aussi un rôle (8).

2. Le phosphore: il se trouve dans les phospholipides pour sa majeure partie.

3. Les bicarbonates: leur taux dans la bile hépatique augmente avec le flux biliaire.

4. Le fer: on observe que 20% de la concentration totale en fer est d'origine plasmatique.

5. Le cuivre est sous forme non dialysable; la bile possède naturellement un grand pouvoir de captation du cuivre.

6. Le manganèse est également sous forme non-dialysable.

b - Les éléments organiques (tableau 4)

1. La bilirubine: elle est sous forme diglucurono-conjuguée pour 70 à 80% dans la bile vésiculaire, et pour 90% dans la bile hépatique. Le reste de la bilirubine est monoconjugué et de faibles quantités sont conjuguées à du glucose, du xylose ou sous forme sulfoconjuguée. Un pour cent de la bilirubine totale est présente sous forme libre.

Le bilirubinate de calcium du calcul biliaire pourrait être dû à la libération de bilirubine sous l'action d'une glucuronidase.

En plus de la bilirubine, on a trouvé d'autres pigments biliaires et près des 2/3 de la bilirubine apparaît sous la forme d'un agrégat moléculaire formant une solution micellaire.

2. Les protéines: elles sont très diverses et viennent en grande partie du plasma mais aussi du foie et de la vésicule biliaire.

3. Les enzymes sont nombreuses: déshydrogénases, transférases, phosphatases, glucuronidases...

4. Les lipides totaux: ils sont sous la forme de lipoprotéines, l'apoprotéine étant de l'albumine. Il s'agit environ de 75% d'acide biliaires, de 20% de phospholipides, de 5% de cholestérol. Les trois acides gras principaux sont l'acide palmitique, l'acide oléique et l'acide linoléique.

- Le cholestérol: il se trouve surtout sous forme libre et seulement à 4% sous forme estérifiée (sels mixtes de sels de sodium d'acides biliaires).

- Les phospholipides: ils sont retrouvés en très grand nombre; il s'agit à plus de 90% de lécithines. La sécrétion des phospholipides est induite par les acides biliaires avec lesquels ils forment des complexes micellaires.

- Acides biliaires: l'acide cholique et l'acide chénodesoxycholique représentent 60 à 90 % des acides biliaires. Ils sont principalement conjugués avec la glycine mais également tauro- ou sulfoconjugués, plus rarement sous forme libre (20).

- Vitamines: acide folique, vitamine B12...

Tableau 3: Composants non-organiques de la bile d'après la référence 18.

	Bile hépatique	Bile vésiculaire
Bicarbonate	30 mmol/L	19 mmol/L
Chlorure	105 mmol/L	66,2 mmol/L
Phosphore	2,9 à 7,20 mmol/L	45 mmol/L
Potassium	4,8 mmol/L	12,8 mmol/L
Sodium	146 mmol/L	209 mmol/L
Calcium	2,6 mmol/L	3,1 à 17,2 mmol/L
Magnésium	0,7 à 1,5 mmol/L	---
Fer	7 à 56 μ mol/L	---
Cuivre	25,3 μ mol/L	87,2 μ mol/L
Manganèse	0,38 μ mol/L	0,20 μ mol/L
Zinc	---	5,4 μ mol/L

Tableau 4: Composants organiques de la bile d'après la référence 18

	Bile hépatique	Bile vésiculaire
Azote total	51 à 55mmol/L	350 mmol/L
Urée	3,93 mmol/L	3,3 à 7,5 mmol/L
Choline	4,7 mmol/L	45 mmol/L
Acide urique	0,26 mmol/L	—
Bilirubine	1,11 mmol/L	4,00 mmol/L
Porphyrines	0,15 mmol/L	—
Protéines totales	1,8 à 7 g/L	18 à 26 g/L
Albumine	634 mg/L	—
a-glycoprotéine	54,7 mg/L	—
a1-antitrypsine		200 mg/L
a2-macroglobuline	44,5 mg/L	—
IgA	166 mg/L	—
IgG	98,8 mg/L	—
Hydrates de carbone	0,35 à 0,91 g/L	2,4 g/L
Acide lactique	2,0 mmol/L	3,0 mmol/L
Lipides:		
lipides totaux	—	77,3 g/L
acides gras libres	—	0,96 mmol/L
cholestérol	4,63 mmol/L	10,4 mmol/L
phospholipides	3,2 mmol/L	33,3 mmol/L
Acides biliaires:		
totaux	25 mmol/L	75,3 mmol/L
acide cholique	—	44,8 mmol/L
ac. chénodésoxycholique	—	29,3 mmol/L
ac. désoxycholique	—	17,1 mmol/L
ac. lithocholique	—	4,0 mmol/L

I.5. PHYSIOPATHOLOGIE

I.5.1. La bilirubine (1, 21)

Dans la bile, la bilirubine a une origine encore mal connue. En effet, on ne peut pas dire à ce jour vraiment si elle est synthétisée par le foie ou si elle provient de l'hydrolyse de la bilirubine conjuguée. Cela dit, des observations faites au cours de syndromes de Crigler-Najjar portent plutôt à penser que celle-ci serait sécrétée par le foie.

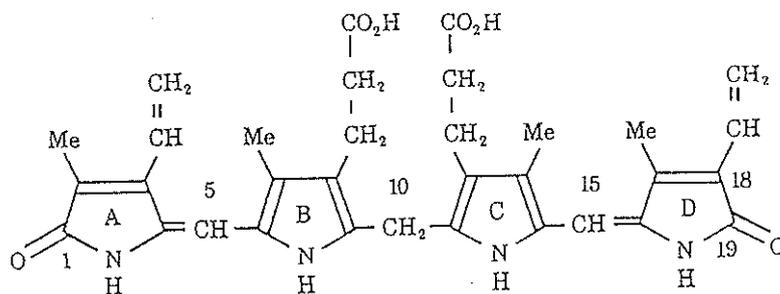


Figure 2: Formule développée plane de la bilirubine IX α

La bilirubine est un pigment tétrapyrrolique (Figure 2), pratiquement insoluble dans les solutions aqueuses neutres. L'analyse structurale, grâce à la méthode de diffraction des rayons X, montre qu'à l'état cristallin, la bilirubine IX α est constituée par quatre noyaux pyrroles, disposés dans l'espace sous la forme de deux plans ressemblant à une tuile de faitage.

Chaque plan correspond à un groupe de deux noyaux pyrroles reliés entre eux par un atome de carbone sp^2 (C^5 et C^{15}) au niveau duquel il existe une mésomérie (délocalisation permanente des électrons π) expliquant la planéité et le caractère aromatique de ces deux systèmes dipyrroliques.

Finalement, dans un cristal de bilirubine, les molécules sont disposées dans l'espace sous la forme d'un empilement comme le montre la figure 3.

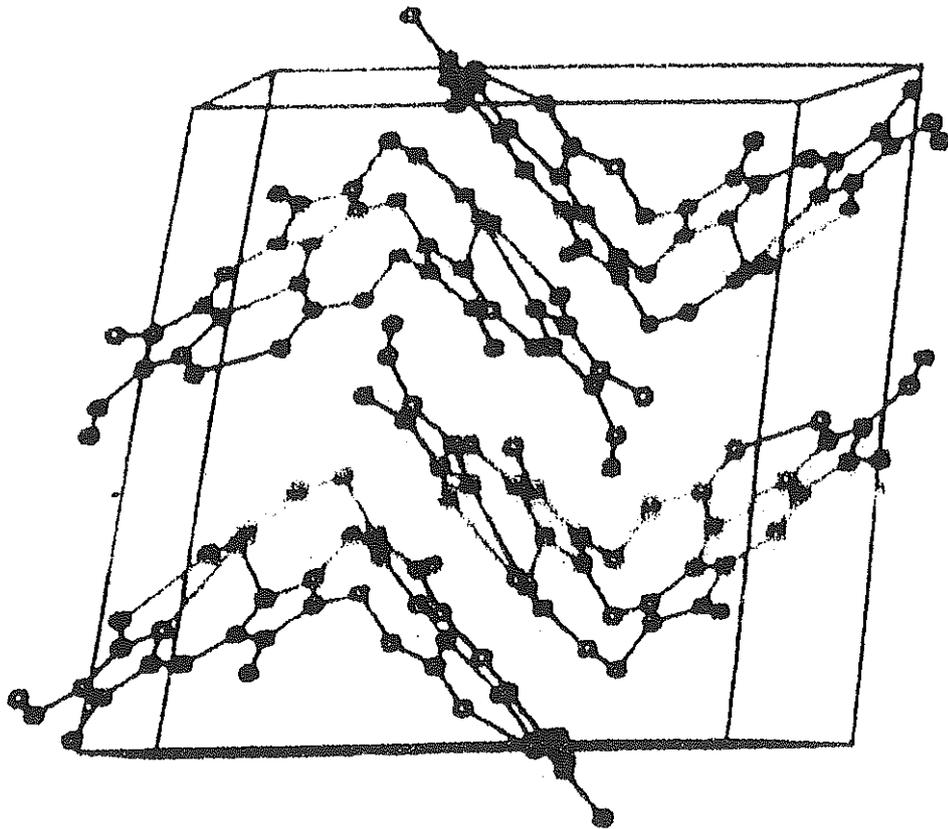


Figure 3: Représentation de la bilirubine IX α dans l'espace d'après BONNET (21).

Cette structure est stabilisée d'autre part, grâce à six liaisons hydrogènes intramoléculaires (Figure 4) . On a alors bien cette configuration en forme de tuile de faîtage avec une arrête sur le C¹⁰. Les deux plans sont séparés par un angle de 98°.

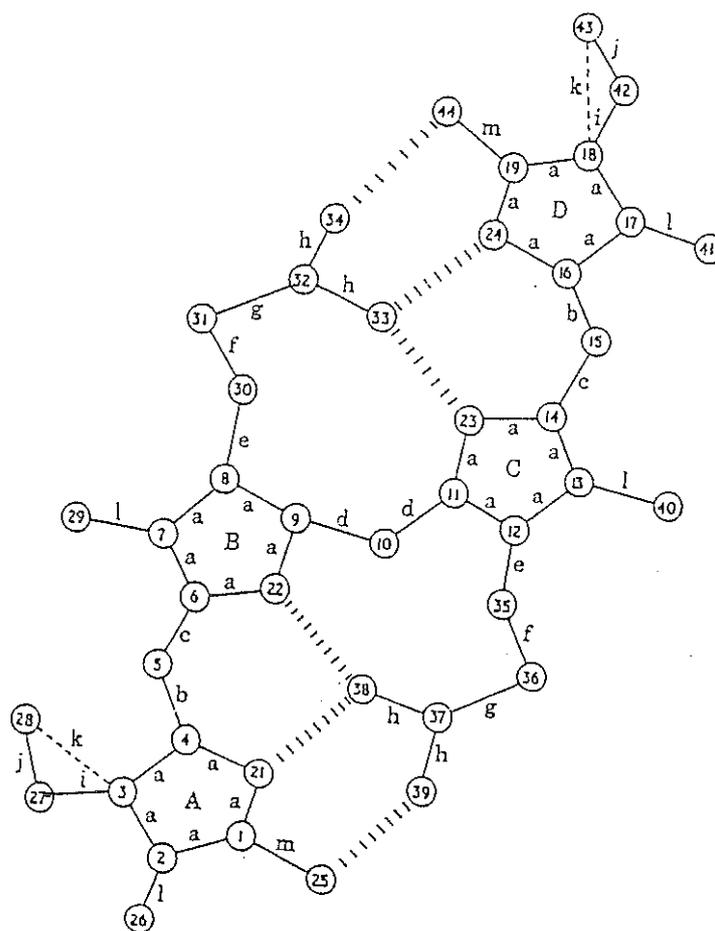


Figure 4: Liaisons hydrogènes (IIIII) dans la molécule de bilirubine IX α d'après BONNET (21).

Une double liaison de configuration Z en C⁵ et C¹⁵ ainsi que ces liaisons hydrogènes intramoléculaires confèrent à la bilirubine une insolubilité dans des solutions aqueuses neutres.

Des études *in-vivo* nous montrent que la bilirubine est solubilisée dans la bile par l'intermédiaire des sels biliaires, et que la bilirubine ionisée est plus soluble que la forme diacide.

La solubilité décroît en fonction de l'apport de lécithines, mais elle n'est pas affectée par un ajout de cholestérol. Ainsi au pH de la bile la bilirubine non conjuguée contribue à la formation de micelles qui l'empêchent de précipiter (17).

Si une liaison en C⁵ ou C¹⁵ passe de la configuration Z à la configuration E, alors les six liaisons hydrogènes de la molécule sont fragilisées, voire rompues. Il en résulte alors une solubilisation dans l'eau.

Une application bien connue de ce phénomène est la photothérapie utilisée pour le traitement de l'ictère du nouveau né. Grâce à cette technique on peut altérer la molécule en la faisant changer de configuration. La molécule devient alors soluble.

I. 5. 2. Genèse des calculs bruns

a - Rôle de l'infection biliaire

On retrouve généralement les calculs bruns dans les voies biliaires et dans le contexte d'une bile infectée. Maki (16) propose que les calculs bruns viennent d'une hydrolyse de la bilirubine conjuguée en forme non-conjuguée. Cette hydrolyse serait due à des β -glucuronidases d'origine bactérienne (*Escherichia coli*, *Bactéroïdes* ou *Clostridium*).

La bilirubine non-conjuguée se lierait alors au calcium ionisé de la bile; il en résulterait une précipitation de bilirubinate de calcium insoluble (22, 23).

Mais on sait aussi que la bile possède un rôle inhibiteur de l'activité β -glucuronidasique (10), grâce à la glucaro-1, 4-lactone, présente dans la bile et connue pour être un puissant inhibiteur des β -glucuronidases.

La bile étant normalement stérile, quel évènement peut favoriser l'infection?

La stase biliaire joue certainement un rôle primordial et on s'accorde à penser que c'est plutôt une stase biliaire, qui favoriserait l'infection de la bile et non une infection qui conduirait à une stase (24). Cette stase entraîne aussi une libération d'enzymes hydrolytiques, de sécrétions pancréatiques ainsi que de mucus vésiculaire (6). Il en résulte une hydrolyse de la bilirubine, mais aussi des lécithines biliaires (25).

Ces phénomènes concourent à une augmentation de la bilirubine libre ou mono-conjuguée et ainsi qu'à une hydrolyse des lécithines.

Il y a alors, une baisse du pouvoir de solubilisation du cholestérol qui, avec le bilirubinate de calcium et les sels de calcium d'acides gras peuvent coprécipiter avec des protéines pour donner un calcul brun.

Cette hypothèse, fort attrayante à été confirmée par les travaux de CETTA en 1986 (4) et il semble fort probable que la stase biliaire, suivie d'une infection, joue un rôle non négligeable dans l'étiopathogénie de la lithiase pigmentaire brune.

b- Autres facteurs favorisants

L'existence d'un reflux duodéno-biliaire, un âge relativement élevé et la présence de matériaux étrangers dans les canaux biliaires (T-tubes) (4) concourent, eux aussi, à l'apparition du calcul brun.

Une stase vésiculaire pourrait aussi être induite par un régime pauvre en protéines. Cela expliquerait, du moins en partie, la diminution de l'incidence des calculs bruns au Japon où comme en Occident, la consommation de protéines augmente (26) et le risque de lithiase pigmentaire diminue.

Les parasites dont le cycle comporte un passage obligatoire par les voies biliaires (ascaris ou douve) sembleraient ne jouer qu'un rôle mineur. En effet dans les zones rurales du Japon où l'ascaridiose semble avoir pratiquement disparu la lithiase intrahépatique persiste (8). Ceci n'empêche pas que l'on ait pu retrouver dans des calculs, des fragments de cuticule d'oeufs

d'*Ascaris lumbricoïdes* qui auraient pu être des agents de nucléation lors de la formation de ces calculs bruns (3).

c -Cas particuliers des endoprothèses biliaires (23)

Nous venons de voir que le bilirubinate de calcium peut précipiter par nucléation hétérogène sur des fragments de parasites. De la même manière, il peut aussi précipiter au contact d'un corps étranger comme la paroi d'une endoprothèse biliaire.

Ces endoprothèses sont de petits drains que l'on introduit par voie endoscopique à l'intérieur de la voie biliaire principale. Leur mise en place constitue un traitement palliatif non chirurgical des ictères par obstacle néoplasique de la voie biliaire principale.

La lumière de ces endoprothèses peut au bout d'un certain temps être obstruée par des dépôts, ou parfois une boue, dont la composition rappelle celle des calculs bruns. Bilirubinate et palmitate de calcium sont majoritaires. On les trouve constamment associés à une composante protéique, et plus rarement à du cholestérol, de la bilirubine et des acides biliaires. L'étude bactériologique de ces dépôts montre la présence de bactéries aéro-anaérobies facultatives. L'origine infectieuse pourrait être expliquée par l'action de phospholipases bactériennes sur les lécithines (4) ainsi que celle de β -glucuronidases bactériennes qui pourraient être responsables de la déconjugaison de la bilirubine chez certains patients ayant développé des calculs bruns. Une β -glucuronidase endogène pourrait jouer un rôle non négligeable (27, 28)(figure 5).

L'adhésion des dépôts pourrait être favorisée par des mucoprotéines inflammatoires d'origine bactérienne (glycocalyx).

Ainsi, l'origine infectieuse paraît vraisemblable. La forte teneur en palmitate de calcium des dépôts obstruant les endoprothèses biliaires suggère un rôle prépondérant de l'activité phospholipasique bactérienne sur l'activité β -glucuronidasique.

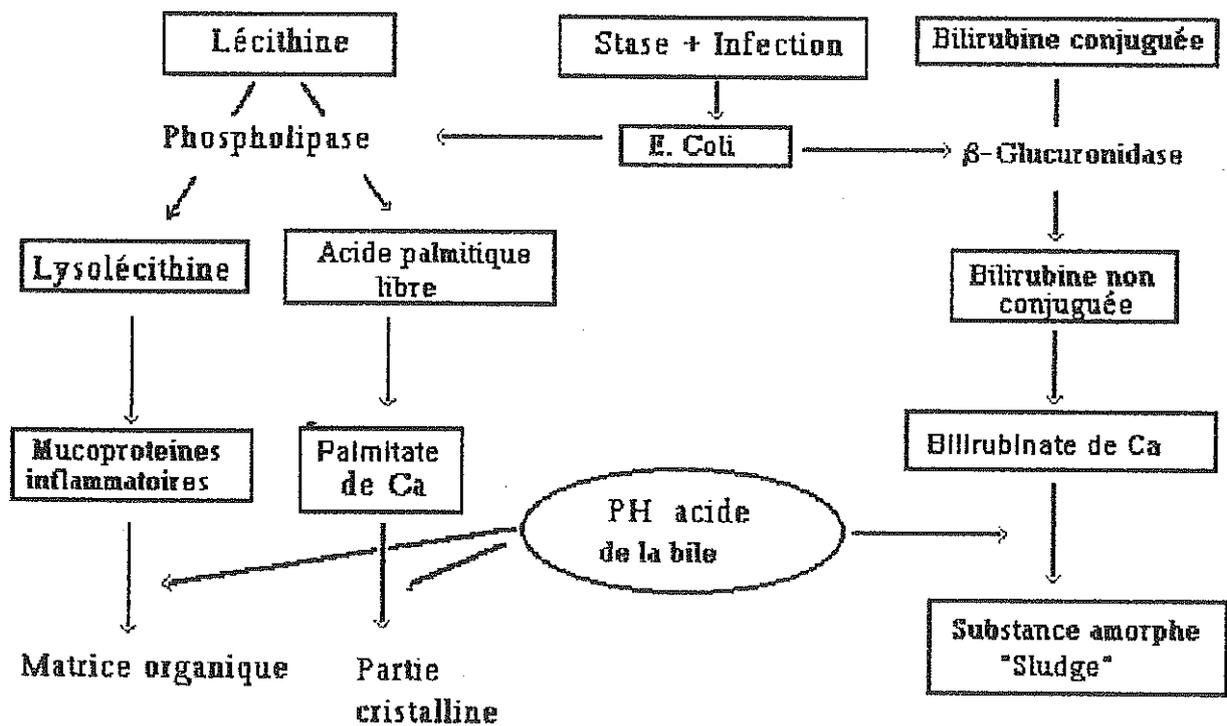


Figure 5: Rôle de la phospholipase dans la genèse des calculs bruns selon CETTA (4)

1.5.3. Genèse des calculs noirs

Les calculs noirs sont formés généralement à l'intérieur de la vésicule biliaire, en conditions d'aseptie. Leur forme est irrégulière, leur diamètre rarement supérieur à 1 cm. Ils sont souvent multiples et leur aspect extérieur est noir, lustré.

Ils sont probablement liés à un déséquilibre métabolique observé lors d'anémies hémolytiques, cirrhose, pose de valvule artificielle (16). L'accumulation de bilirubine non-conjuguée et de bilirubinate à l'intérieur de la vésicule précéderait le développement des pigments noirs (15). Il semblerait que la formation de ces pigments noirs commence à partir de la polymérisation d'une unité tétrapyrrolique et non dipyrrolique. De même, des métaux, tels le fer et le cuivre jouent un rôle non négligeable dans la formation de la substance noire de ces calculs (29).

a - Rôle de l'hyperhémolyse (6):

Les calculs noirs observés au cours d'hyperhémolyse chroniques pourraient être liés à l'augmentation de la sécrétion de bilirubine. Au cours d'une hyperhémolyse, la sécrétion biliaire de bilirubine et de bilirubinate conjugué est dix fois plus élevée que la normale. Cette sécrétion élevée en bilirubine est souvent associée à une fréquence importante de patients ayant des calculs noirs.

On notera qu'un facteur favorable à la solubilisation de la bilirubine est le pH de la bile (30). Ainsi, chez le cirrhotique on a souvent et simultanément une baisse de l'acidité biliaire qui pourrait

être la cause de l'apparition de calculs noirs, et une hyperhémolyse fréquente. En outre, la sécrétion des acides biliaires dans la bile est diminuée, ce qui pourrait conduire à une diminution de la capacité de solubilisation de la bilirubine.

b - Rôle des sels biliaires

La formation et la précipitation des sels de bilirubinate de calcium sont favorisées par le manque d'effet tampon des sels biliaires à l'encontre du calcium et des mono-anions de bilirubine non-conjuguée. L'importance des sels biliaires en tant que facteurs protégeant la survenue des calculs pigmentaires a été confirmée récemment par des observations *in vitro* du taux de bile naissante: on y voit une précipitation spontanée de bilirubine, surtout sous la forme de sels de calcium, qui apparaît après une diminution du pool des sels biliaires. On a pu noter qu'un taux élevé de bilirubine mono-conjuguée et un rapport sels biliaires sur bilirubine non-conjuguée égal à 1/3 sont des facteurs indépendants mais prédisposants à la formation de calculs pigmentaires noirs (28). Ainsi, sur une population de cirrhotiques, la bilirubine est en quantité élevée et le rapport sels biliaires sur bilirubine non-conjuguée est diminué, ce qui entraîne un risque accru de lithiase pigmentaire noire (28).

c - Rôle de la mucine

Nous avons vu précédemment, qu'en plus du bilirubinate de calcium, nous retrouvons aussi dans les calculs noirs, du phosphate, du carbonate de calcium, ainsi que de la mucine (7, 31). La sécrétion de mucine, par l'épithélium de la vésicule, est un

facteur lithogène. La mucine peut servir de ciment entre les microparticules de bilirubinate de calcium; cela donne un microprécipité dont la taille est augmentée par la coprécipitation des carbonates et des phosphates (6), habituellement présents à des taux très faibles dans la bile.

d - Rôle du dioxyde de carbone

Dans la bile des patients , ayant une pression partielle élevée en CO_2 total et une absence de carbonate de calcium, les calculs sont composés de bilirubinate et de carbonate de calcium (13).

Des valeurs supérieures à 29 mmol/l de CO_2 sont presque toujours associées à la présence de carbonate de calcium à la surface du calcul. Cette concentration élevée pourrait bien être due à un dérèglement de la sécrétion de sécrétine, favorable à l'apparition de calculs noirs.

e - Formation de polymères (17) :

Les initiateurs de la polymérisation sont mal connus. La peroxydation de la bilirubine conduit à la formation de dérivés multicolores résultants de l'oxydation des ponts méthènes. La solidification des polymères est un mécanisme lent et on observe aussi que plus le calcul se forme lentement plus l'état de polymérisation est élevé.

Une hypothèse raisonnable serait que tous les calculs pigmentaires débutent par la nucléation du bilirubinate de calcium

monomérique sur une matrice mucoprotéique, suivie d'une polymérisation au sein de cet élément solide.

Dans la bile infectée, des concentrations élevées de β -glucuronidase bactérienne conduisent à la formation rapide de bilirubine non-conjuguée qui précipite sous la forme de bilirubinate de calcium. La formation du calcium est rapide, celle des polymères s'étale sur une courte période et les calculs sont alors principalement formés de bilirubinate de calcium.

En outre, une activité β -glucuronidasique plus faible pourrait engendrer une précipitation et une accrétion du bilirubinate de calcium plus lente, ce qui donnerait tout le temps aux polymères de se former. Il y aurait alors développement de calculs noirs. Cela dit, aucun travail à ce jour, n'a pu démontrer ce phénomène.

1.6. IDENTIFICATION ET TRAITEMENTS DES CALCULS PIGMENTAIRES (8)

1.6.1. Identification

Sur la base des données radiographiques ou échographiques, l'identification des calculs pigmentaires, est quasi-incertaine sur un cas individuel.

La majorité des calculs bruns n'est pas visible à la radiographie et seulement 50% des calculs noirs sont identifiables sur une radiographie d'abdomen sans préparation, car ceux-ci ont au moins 4% de calcium. A la cholécystographie, les calculs dits flottants ne sont jamais de nature pigmentaire mais toujours

cholestérolique. Par contre, les calculs radio-opaques, d'aspect irrégulier, non flottants et de 10 mm de diamètre, sont presque toujours des calculs pigmentaires. Seulement 3% des calculs solitaires sont des calculs pigmentaires.

En Occident, environ 50% des calculs cholédociens qui ont récidivé et la quasi-totalité des calculs cholédociens et intrahépatiques en Orient sont des calculs bruns. Mais il n'y a aucun critère radiologique pour les distinguer des calculs cholestéroliques. Par ailleurs, les calculs pigmentaires, contrairement aux calculs cholestéroliques ne sont pas accessibles au traitement médical par dissolution classique.

I.6.2. Thérapeutique de dissolution des calculs pigmentaires (17)

Les pigments noirs sont insolubles dans tous les solvants, sauf s'ils sont dégradés à une température élevée (31). On nourrit quelques espoirs de dissoudre ces calculs noirs, "in vivo", par perfusion intracaniculaire d'acides biliaires, d'acide mono-octanoïque, d'EDTA ou des trois ensembles, mais actuellement les résultats en restent là.

A ce jour une approche possible de dissolution pourrait consister en l'introduction de micro-organismes ou d'enzymes susceptibles de dissoudre la chaîne polyvinyl ou les ponts méthènes ce qui nous donnerait deux demies fonctions dipyrroliques. Expérimentalement la coupure des ponts méthylènes altère le degré

de liaison des calculs noirs. De plus, même si les polymères ne peuvent être dissouts, les autres composants des calculs pigmentaires se cassent, comme l'on montré LEUCHER et coll. (32) en 1981.

Des perfusions intraductales de nombreux composés sont capables de dissoudre plus de 70% des calculs mixtes: l'EDTA disodique (chélation du calcium et conversion du précipité de sels de calcium en sels de sodium soluble) , les acides biliaires, le mono-octanoate glycérique (dissolution du cholestérol lipidosoluble, des acides gras et de la bilirubine non conjuguée) , la trypsine ou la papaïne (digestion de la matrice mucoprotéique du calcul).

Les solutions sont tamponnées à pH alcalin avec de la carosine afin de maximaliser l'effet chélateur de l'EDTA et l'activité des enzymes protéolytiques.

I. 6. 3. Perspectives d'avenir dans la lutte contre les calculs pigmentaires

Nous avons vu qu'un taux de calcium intra-vésiculaire élevé favorise la formation de calculs pigmentaires. Afin de réduire le risque lithogène, il faudrait favoriser la réabsorption du calcium par la vésicule; la baisse de la concentration en calcium libre dans la bile, limiterait ainsi la possibilité de précipitation du bilirubinate de calcium (33).

Afin de faire décroître ce taux de calcium, il serait possible d'utiliser des sels biliaires qui sont d'excellents tampons dans la bile. L'intérêt serait d'avoir une fonction carbonyle et une fonction

sulfonyl, ce qui pourrait être le cas avec un taurocholate, un glycocollate ou la sérum albumine (34).

Des approches futures pourraient viser à augmenter la prévention chez les sujets à risques en leur prescrivant un régime particulier destiné à augmenter l'effet inhibiteur des β -glucuronidases dans la bile. Des agents chélateurs cholédophyles pourraient baisser l'activité du calcium dans la bile, ainsi que celle des inhibiteurs de la sécrétion de mucoprotéines dans la vésicule biliaire.

1. 7. LES METHODES D'ANALYSE DES CALCULS (2, 15, 35-38)

L'analyse des calculs biliaires doit tenir compte des caractéristiques morpho-constitutionnelles des calculs.

On sait que la plupart des calculs sont hétérogènes; ils associent souvent dans une même couche concentrique ou dans des couches différentes, des constituants de nature physico-chimique diverses.

Par conséquent, l'étude de la composition chimique doit porter sur toutes les zones structurellement différentes de la surface et de la section du calcul.

A l'heure actuelle, aucune méthode appliquée isolément ne peut prétendre apporter suffisamment d'informations sur les

caractéristiques morphologiques et constitutionnelles d'un calcul donné.

De ce fait il faut utiliser plusieurs techniques complémentaires permettant de nous renseigner sur la composition chimique, la nature des phases cristallines et la structure des échantillons étudiés (39, 40).

Plusieurs techniques sont applicables à l'analyse des calculs; elles peuvent être divisées en deux groupes: les techniques chimiques et les techniques physiques.

I. 7. 1. Techniques chimiques

I. 7. 1. 1. Méthodes qualitatives (35, 41)

Ce sont les plus anciennes et les plus utilisées en pratique courante.

Ces méthodes reposent sur la propriété plus ou moins spécifique que possèdent certains ions, radicaux ou molécules de réagir avec un ou plusieurs composés chimiques aboutissant au développement d'une coloration ou d'une phase cristalline caractéristique. Ces analyses chimiques qualitatives sont simples et peuvent être utilisées par n'importe quel laboratoire; néanmoins, elles sont inadaptées à une analyse précise des calculs pour différentes raisons:

- elles nécessitent une quantité d'échantillons souvent importante, rendant délicate l'analyse des petits calculs.

- de par leur sensibilités respectives parfois très différentes, elles peuvent conduire à une sous-estimation ou une surestimation des constituants, voire aboutir à des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

- elles ne permettent pas d'associer les ions qu'elles caractérisent et ne donnent aucune information sur les phases cristallines présentes dans le calcul.

- enfin, elles recherchent la présence d'ions ou de molécules prédéterminés et qui sont considérés comme courants. Mais, elles ne permettent en aucun cas d'identifier des métabolites rares, ou des lithiases médicamenteuses.

1. 7. 1. 2. Méthodes quantitatives (36)

La plupart de ces méthodes utilisent des réactions chimiques ou biochimiques spécifiques développées pour le dosage de paramètres biologiques dans le sang ou l'urine. Elles permettent une identification et une quantification des ions courants et indirectement la détection de composants inhabituels lorsque toutes les réactions sont négatives ou faiblement positives. Toutefois ces

techniques sont longues et malgré un avantage de sensibilité sur les techniques précédentes, elles présentent pratiquement les mêmes inconvénients et limites.

En conclusion, ces méthodes chimiques ne doivent pas être utilisées seules; elles se révèlent par contre très utiles lorsqu'elles sont associées à des techniques physiques globales.

I. 7. 2. Techniques physiques

Ces techniques sont plus intéressantes car elles sont plus sélectives et plus sensibles que les techniques chimiques.

On distinguera les méthodes fragmentaires et les méthodes globales.

I. 7. 2. 1. Les méthodes fragmentaires

Ces méthodes consistent à associer plusieurs techniques d'analyse, chacune pouvant apporter une information particulière et précise mais aucune ne permettant une analyse complète du calcul.

Ainsi la spectrométrie d'absorption atomique permet de doser aisément certains ions métalliques comme le calcium et le magnésium et de rechercher quelques autres métaux si l'on dispose des lampes adéquates.

La spectrométrie d'émission atomique à plasma (42) permet également la détermination de nombreux éléments, notamment métalliques: Ag, Al, B, Bi, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, Si, Sn, Zn.

La chromatographie ionique permet le dosage des cations alcalins et alcalino-terreux ainsi que de nombreux anions organiques ou minéraux, si l'on dispose des colonnes et des détecteurs convenables. C'est une méthode intéressante par ses potentialités et par la rapidité de l'analyse et de la détection des cations courants; elle est plus longue si l'on veut doser aussi les anions.

De la même manière, les sondes ioniques permettent la détection de nombreux ions ou atomes, mais elles travaillent sur des zones très ponctuelles du calcul nécessitant un balayage de la section avec de nombreuses mesures.

De surcroît, elles ne détectent pas les atomes de faible poids moléculaire et ne permettent pas la caractérisation objective des molécules organiques.

Par contre, certaines méthodes comme la spectrométrie de masse ou les techniques chromatographiques (chromatographie sur couche mince, chromatographie liquide à haute pression) sont applicables essentiellement à l'identification des molécules organiques (43, 44).

Mais, point important, aucune de ces méthodes ne tient compte des formes cristallines des constituants lithiasiques, ni de leur degré d'hydratation, perdant ainsi une partie de l'information contenue dans les calculs.

I. 7. 2. 2. Méthodes globales

Les méthodes globales sont, de loin, les plus utilisées dans les centres spécialisés.

La plupart d'entre elles permettent à la fois d'apprécier la composition moléculaire et la structure cristalline du calcul étudié.

Elles peuvent donc détecter des substances inhabituelles présentes au sein du calcul, en particulier des médicaments.

a - Techniques radiographiques (8, 45-47)

Ces techniques sont employées de manière courante dans le cadre de l'approche diagnostique de la lithiase biliaire, mais elles permettent aussi de nous orienter sur la nature du calcul considéré

Quatre critères sont pris en compte pour apprécier la composition d'un calcul; le degré d'opacité aux rayons X, la répartition des zones de densité différente en cas d'image hétérogène, la taille et la forme du calcul.

L'opacité sera d'autant plus grande que le pourcentage d'atomes lourds dans la molécule sera plus élevé: la mise en évidence radiologique de calculs biliaires peut être obtenue directement par la prise de clichés sans préparation de la région sous-hépatique, à condition que la constitution du calcul comporte des éléments radio-opaques, en l'occurrence divers sels de calcium, en quantité suffisante (taux minimal de 4%).

Ces calculs spontanément visibles radiologiquement sont:

- le plus souvent des calculs cholestéroliques possédant une coque calcifiée épaisse dessinant le contour arrondi ou polygonal du calcul. Il existe également des formations comportant plusieurs couches concentriques opaques ou des calculs en "halo", ou en "cocarde" en cas de noyau calcique entouré de matériau radiotransparent.

- plus rarement des calculs pigmentaires à type de calculs noirs, mais aussi des calculs de carbonates, de phosphates, ou de palmitate de calcium. Il s'agit d'éléments denses et homogènes, parfois hérissés de spicules, mais habituellement de petite dimension, mobiles les uns par rapport aux autres selon la position du patient.

Ces calculs radio-opaques représentent classiquement moins de 15% de la totalité des calculs.

b - Méthodes optiques (48,49)

La plupart des constituants lithiasiques cristallisent sous des formes qui conduisent à des structures de calculs caractéristiques dont la reconnaissance optique peut être très intéressante.

La simple observation attentive d'un calcul (surface et section) à l'aide d'un stéréomicroscope est très utile pour apprécier les détails de la structure des zones cristallines et amorphes, ainsi que leur répartition au sein du calcul. Elle permet aussi de suspecter la présence de composés nouveaux au niveau d'une zone de coloration ou d'aspect inhabituels. Il faut examiner les calculs sous un grossissement minimal de $G \times 10$, mais un grossissement supérieur est souvent nécessaire pour étudier la zone de nucléation ou lorsqu'il s'agit de très petits calculs.

D'autres méthodes optiques peuvent être employées, par exemple la microscopie à polarisation (48, 49) qui permet, à partir de couches minces de calcul, de déterminer la plupart des espèces cristallines présentes.

La microscopie en contraste de phase permet l'étude de calculs comprenant des composés comme les phosphates de calcium ayant une faible réfringence.

La microscopie électronique à balayage (50, 51) permet d'examiner les structures fines des calculs en trois dimensions, d'observer les faciès cristallins à fort grossissement et, donc, de

déterminer les espèces cristallines. On peut aussi étudier l'architecture intime du calcul, les relations structurales entre les diverses phases minérales ou organiques et la matrice protéique. Il s'agit d'une technique onéreuse, mais son apport peut être précieux pour des études morphologiques ou de composition élémentaire, surtout lorsqu'elle est couplée à un analyseur X, l'EDAX (Energy Dispersive Assay X). Celui-ci permet de caractériser les atomes de numéro atomique Z supérieur à 11 sur n'importe quelle zone de l'échantillon sélectionné sous le microscope (39).

c - Méthodes cristallographiques (45-47, 52)

Il s'agit principalement de l'analyse par diffraction des rayons X.

Le balayage d'un échantillon de poudre cristalline par un faisceau de rayons X monochromatiques produit une réflexion sur des plans d'atomes.

Cette diffraction permet d'imprimer sur un film photographique des lignes d'intensité et d'espacement caractéristiques des substances cristallines. Cette méthode nécessite moins de 1 mg d'échantillon réutilisable et permet l'identification des composés chimiques cristallisés.

Il s'agit cependant, d'un examen délicat et coûteux et qui, de plus, ne permet pas l'analyse des constituants amorphes souvent présents dans les calculs (phosphates amorphes de calcium, protéines...).

Depuis quelques années, il est possible de coupler les diffractomètres X à des systèmes informatiques qui effectuent une analyse automatique des diagrammes par comparaisons à des fichiers de référence. Mais la fiabilité de ces systèmes appliqués à l'analyse des calculs n'est pas démontrée.

d - Méthodes spectroscopiques

Si un essai d'analyse des calculs biliaires par résonance magnétique nucléaire du ^{13}C a été effectué (53), en fait seules deux techniques de spectroscopie moléculaire sont particulièrement intéressantes pour l'analyse des calculs.

- microsonde moléculaire à laser (MOLE) ou microsonde Raman

Cette technique offre la possibilité d'obtenir un spectre moléculaire partiellement dépendant du système cristallin sous lequel se présente le corps étudié. Sa grande supériorité sur toutes

les méthodes décrites ci-dessus est sa capacité à fournir le spectre moléculaire spécifique de cristaux extrêmement petits, de 1 à 3 microns, grâce à la focalisation du rayon laser sur l'échantillon au travers d'un microscope optique à haute résolution.

De conception récente, cette sonde a encore été très peu utilisée dans le domaine des lithiases (54), mais devrait certainement y trouver un champ d'application intéressant pour l'avenir.

Cependant, cette technique possède deux inconvénients: la fluorescence des milieux biologiques complexes et l'échauffement au point d'impact du rayon laser qui entraîne la modification voire la destruction des structures les plus fragiles.

- spectrophotométrie infrarouge (11, 45, 55-57)

Elle semble être la technique spectroscopique de choix. En fait, il s'agit d'une méthode particulièrement efficace, simple, rapide et précise, dont le principe est brièvement exposé ci-dessous:

L'irradiation d'une molécule par un rayonnement électromagnétique du domaine de l'infrarouge (IR) entraîne des mouvements de vibration et de rotation des différents atomes de la molécule entre eux. Ainsi, à chaque groupe d'atomes susceptibles d'entrer en vibration ou en rotation suivant une fréquence qui lui est propre correspond une bande d'absorption à une longueur d'onde

déterminée, d'où finalement un spectre caractéristique du produit considéré.

La spectrophotométrie IR présente plusieurs avantages:

- Sa mise en oeuvre nécessite une faible quantité de matière (1 à 2 mg), ce qui s'avère particulièrement avantageux pour l'examen de très petits calculs ou de minuscules zones d'une lithiase hétérogène; par la technique du micropastillage, il est même possible d'enregistrer un spectre avec environ 40 μ g de produit.

- Contrairement aux méthodes chimiques, elle caractérise des molécules et des ions séparément, permettant ainsi de conclure avec certitude à la présence d'une substance donnée, minérale ou organique, quelque soit son état, cristallisé ou amorphe.

- Elle permet de faire une bonne estimation quantitative des divers constituants quels que soit leur nature chimique ou leur état cristallin.

- le spectre d'un constituant inconnu peut être conservé et étudié à posteriori au vu de nouvelles informations.

- Il est possible de réaliser une analyse qualitative du spectre basée sur la notion de fréquence de groupe des fonctions organiques et cet aspect de la spectrophotométrie IR est primordial pour l'étude des lithiases médicamenteuses (58-62).

Néanmoins la spectrophotométrie IR présente quelques inconvénients:

- Si le prix d'un appareil dispersif de routine est abordable, un spectrophotomètre IR à transformé de FOURIER (IRTF) est d'un coût supérieur. La différence de prix entre ces deux techniques est cependant grandement justifiée par les performances optiques finales de l'IRTF (résolution, précision en longueur d'onde, rapport signal/bruit, rapidité).

- L'analyse de mélanges particuliers peut soulever quelques difficultés sur le plan qualitatif et, par conséquent sur le plan quantitatif. Pour pallier à cet inconvénient, un spectrophotomètre IRTF peut être couplé à un système informatique traitant les spectres. On peut ainsi effectuer la conversion d'un spectre de transmission en absorbance, additionner ou soustraire les spectres afin de mieux détecter les différents composants d'un mélange, agrandir des zones spectrales présentant un certain intérêt, redresser ou lisser la ligne de base du spectre ou rechercher automatiquement un spectre inconnu dans des bibliothèques spécialisées.

Enfin un développement très intéressant se dessine actuellement au niveau de la technique IRTF grâce à l'apparition de microscopes IR (63) qui vont permettre de réaliser des analyses

pratiquement du même type que celles effectuées à l'aide de la microsonde à laser MOLE, mais sans en avoir les inconvénients.

Il sera ainsi possible d'analyser de petits cristaux (jusqu'à $10 \mu\text{m}$) ou des portions très faibles de calculs (inférieurs à $5 \mu\text{g}$).

DEUXIEME PARTIE :
EXPERIMENTATION

II. DEUXIEME PARTIE: EXPERIMENTATION

Nous avons vu dans la partie précédente, que le composant que l'on retrouve de façon constante dans les calculs pigmentaires est le bilirubinate de calcium, éventuellement sous ses trois formes, acide, neutre ou intermédiaire.

Nous allons donc diriger notre expérimentation vers l'analyse de ce bilirubinate de calcium. Dans le cadre de notre étude il est indispensable de disposer des trois formes de bilirubinate de calcium à l'état pur. Ces produits n'existant pas dans le commerce, nous avons dû les synthétiser, notamment en se basant sur le protocole utilisé par SUTOR et WILKIE (13).

Nous pourrions ainsi enregistrer les spectres infra-rouges de ces produits et étudier leur comportement en chromatographie sur couche mince.

II. 1. SYNTHÈSES

II. 1. 1. Matériel et réactifs

- Dessiccateur sous vide chauffant SOTELEM DR 3002
 - Plaque chauffante SCHOTT CERAN Réf. CK111.
 - Centrifugeuse HETTICH 5000 t/min.
 - PH-mètre MERCK pH 85.
 - Agitateur magnétique chauffant HOTSPIN 2.
-
- Bilirubine purum Réf. 14370.
 - Chlorure de calcium dihydraté Réf. MERCK 2 382.
 - Chloroforme Réf. SDS 2437 E.
 - Hydroxyde de sodium Réf. MERCK 6498.
 - Triéthanolamine Réf. MERCK 8 379.
 - Méthanol Réf. MERCK 6 007.
 - Hydroxyde de calcium Réf. MERCK 2047.
 - Acide chlorhydrique 1N Réf. MERCK 9057.
 - Dioxane Réf. MERCK 9671.
 - Diméthyle sulfoxyde Réf. MERCK N°2952.

II. 1. 2. Principe

Toutes les synthèses sont réalisées sur le principe suivant:

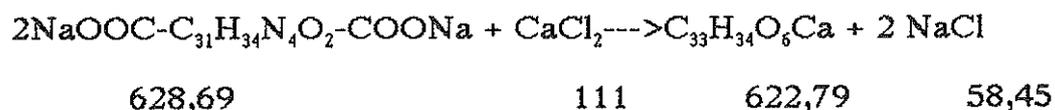
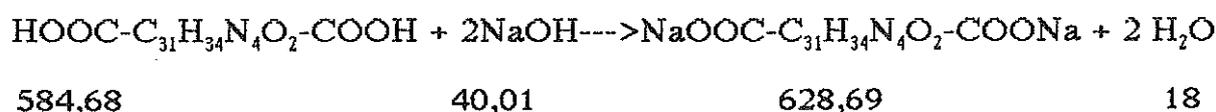
Le bilirubinate de calcium est préparé par réaction de la bilirubine avec un sel de calcium. Les synthèses sont faites par réaction de double décomposition: dans un premier temps on fabrique un sel de sodium qui réagit dans un second temps avec le chlorure de calcium que l'on utilise en excès afin d'être sûr que le maximum de bilirubinate de sodium réagisse.

Comme nous l'avons vu dans les généralités, le bilirubinate de calcium peut se trouver sous trois formes, à savoir la forme neutre, la forme acide et la forme intermédiaire. Nous allons donc synthétiser ces trois formes ainsi qu'une forme polymère de la bilirubine, présente dans les calculs pigmentaires noirs.

II. 1. 3. Synthèse du bilirubinate de calcium neutre

Equations de la réaction

Cette équation est valable pour les trois types de synthèse qui suivent:



II. 1. 3. 1. Synthèse selon EDWARDS (11)

Protocole

1° 25 mg de bilirubine (soit $4,3 \times 10^{-5}$ moles) sont pesés puis dissous dans 100 ml de chloroforme (ajoutés en quatre fois 25 ml), la bilirubine étant fortement soluble dans le chloroforme.

2° Ce mélange est porté à ébullition, puis filtré à chaud, le but étant de se débarrasser des impuretés insolubles.

3° Le filtrat est placé dans une ampoule à décanter avec 50 ml d'une solution aqueuse comportant 3,4 mg (soit $8,6 \times 10^{-5}$ moles) d'hydroxyde de sodium.

4° On agite le mélange, puis on laisse les deux phases se séparer pendant une heure.

5° Le bilirubinate de sodium formé passe dans la phase aqueuse où il est soluble. La phase chloroformique, de densité supérieure, est rejetée.

6° A la phase aqueuse brun foncé, recueillie dans un bécher, on rajoute une solution de 9,5 mg (soit $8,6 \times 10^{-5}$ moles) de chlorure de calcium dihydraté dans 50 ml d'eau.

7° On agite le mélange à température ambiante pendant deux heures, à l'aide d'un agitateur magnétique.

8° Le précipité formé est alors filtré, lavé successivement à l'eau distillée, à l'éthanol et au chloroforme afin d'obtenir un produit le plus pur possible.

9° Le produit obtenu est séché à 30° sous vide.

Remarques: Nous avons légèrement modifié le protocole de EDWARDS (11), à savoir:

- nous avons utilisé une bilirubine beaucoup plus pure;
- seulement 100 ml de chloroforme sont utilisés au lieu de 300 ml;
- alors que EDWARDS n'utilisait qu'un lavage à l'eau, dans notre cas le produit a été lavé à l'eau, à l'éthanol puis au chloroforme dans lequel la bilirubine est beaucoup plus soluble.

Résultat

Nous avons obtenu 19,8 mg de produit brun foncé et amorphe.

Le rendement est de 73,9 %

II. 1. 3. 2. Synthèse selon MAKI (12)

Protocole

1° 25 mg de bilirubine sont dissous dans 10 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N; on peut aussi les dissoudre dans une solution d'hydroxyde de potassium 0,1 N.

2° A cette solution sont ajoutés goutte à goutte, 10 ml d'une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de calcium, jusqu'à apparition d'un précipité.

3° On agite pendant 40 minutes à température ambiante, puis on centrifuge 15 minutes à 4000 t/m.

4° Le précipité est soigneusement lavé avec de l'eau, afin d'enlever l'excès d'hydroxyde de calcium et d'hydroxyde de sodium; il est ensuite lavé à l'éthanol, et enfin au chloroforme, afin d'éliminer la bilirubine n'ayant pas réagi.

5° le produit obtenu est séché sous vide 24h à 30°C.

Résultat

Nous avons obtenu 14,1 g de produit brun foncé et amorphe.

Le rendement est de 52,6 %

II. 1. 3. 3. Synthèse selon SUTOR et WILKIE (13)

Cette synthèse permet en fonction du pH d'obtenir un sel acide, neutre ou intermédiaire.

Protocole

Préparation des réactifs:

- solution tampon de triéthanolamine à 0,29 mol/L (432,6 mg dans 10 ml d'eau). On ajuste cette solution au pH désiré à l'aide de HCl 1N. Afin d'obtenir le sel neutre on fixe le pH au dessus de 7,8.

- solution de chlorure de calcium à 0,14 mol/L, que l'on aura en excès dans la réaction afin d'être sûr que toute la bilirubine réagisse; on utilise 3,5 mmoles de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (soit 514,6 mg) dans 25 ml d'eau distillée.

- Préparation extemporanée d'une solution de bilirubinate de sodium: 85 μmoles de bilirubine (50 mg de produit) sont mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée; la bilirubine est dissoute à l'aide de NaOH 1N ajouté goutte à goutte, jusqu'à clarification totale de la solution.

Synthèse

La solution de CaCl_2 est ajoutée au tampon triéthanolamine; le pH reste assez stable. On ajoute la solution de bilirubinate de sodium; le pH augmente de 0,2 unités. On laisse la réaction évoluer pendant 2h à température ambiante et sous agitation constante.

Le composé gélatineux formé est récupéré par centrifugation à 3000t/mn. , lavé plusieurs fois à l'eau puis à l'éthanol et en dernier lieu au chloroforme.

Le produit est séché sous vide pendant 24h à 40° C.

Résultats

Nous obtenons 42 mg de produit, soit un rendement de 79,4% .

Microanalyse élémentaire (S. C. A. du C. N. R. S. , 69390

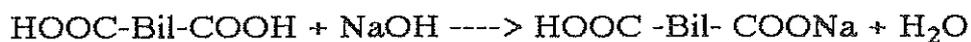
VERNAISON):

- Pourcentage théorique en calcium: 6,44 % .
- Pourcentage en calcium du produit obtenu: 7,40 % .

II. 1. 4. Synthèse du bilirubinate de calcium acide

Equations de la réaction

Soit Bil = C₃₁H₃₄N₄O₂

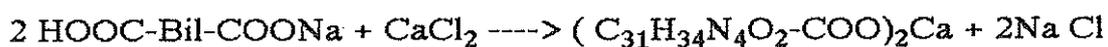


584,68

40,01

606,69

18



606,69

111

1207,48

58,45

Protocole

La synthèse est menée selon la méthode de SUTOR et WILKIE déjà utilisée pour synthétiser le sel neutre; pour le sel acide on a fixé le pH entre 6,3 et 7,4.

Résultats

Nous obtenons 48,9 mg de produit, soit un rendement de 95,3%.

Microanalyse élémentaire (S.C.A. du C.N.R.S., 69390 VERNAISON) :

- Pourcentage théorique en calcium: 3,32 %.
- Pourcentage en calcium du produit obtenu: 3,50 %.

II.1.5. Synthèse du bilirubinate de calcium intermédiaire

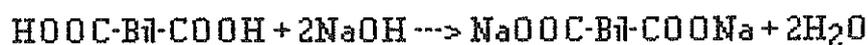
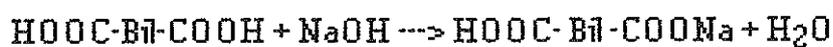
Equation de la réaction:

D'après SUTOR et WILKIE la formule brute du bilirubinate de calcium intermédiaire comporte 1,5 motif de bilirubine par atome de calcium. En fait, il est plus précis de dire qu'elle comporte trois motifs de

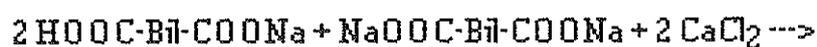
bilirubine pour deux atomes de calcium, ce que les équations suivantes indiquent clairement.



* Synthèse des bilirubinate acide et neutre de sodium:



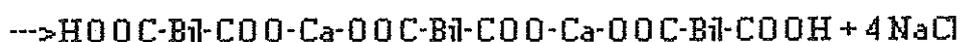
* Synthèse du bilirubinate de calcium intermédiaire:



606,69

628,69

111



1830,05

58,45

La formule brute du bilirubinate de calcium acide est
donc: $\text{C}_{99}\text{H}_{104}\text{N}_{12}\text{O}_{18}\text{Ca}_2$

Protocole

Il suit la méthode de SUTOR et WILKIE, mais ici le pH est stabilisé entre 7,4 et 7,8.

Résultats

Nous obtenons 48 mg de produit, soit un rendement de 92,6 %.

Microanalyse élémentaire (S.C.A. du C.N.R.S., 69390 VERNAISON):

- Pourcentage en calcium théorique: 4,38 %
- Pourcentage en calcium du produit obtenu: 4,10 %

II.1.6. Synthèse du polymère de bilirubine

Protocole :

Les méthodes de SUZUKI (64, 65) ayant été controversées, nous avons utilisé le protocole de BURNETT, DWYER et KENNARD (66).

- Des calculs pigmentaires noirs sont finement broyés. Ils sont mis à chauffer à reflux pendant 8 heures dans le dioxane. On obtient une solution brun-jaune contenant du cholestérol et des stéroïdes qui est éliminée par filtration et un résidu noirâtre qui est conservé.

-Le résidu est repris à chauffer à reflux pendant 8 heures avec du chloroforme. On obtient une solution jaune de bilirubine qui est écartée et un résidu récupéré par filtration.

- Le résidu est repris et mis à chauffer à reflux 8 heures dans le diméthylsulfoxyde pour enlever toute trace de bilirubinate de calcium. On obtient une solution brun-vert, la bilirubine étant convertie en biliverdine. On filtre et on garde le résidu.

- le résidu est repris et chauffé à reflux 20 minutes dans l'acide chlorhydrique 2N pour enlever les carbonates et les phosphates. On filtre et on garde le résidu.

- Le résidu est repris et chauffé à reflux 20 minutes dans la soude 1N. Cette opération sert à éliminer l'apatite et les lipides. On filtre et on garde le résidu noir que l'on lave par l'eau distillée et que l'on sèche sous vide pendant 24h à 40°C.

Résultat:

On obtient un produit noirâtre qui est théoriquement exempt de calcium; ceci est confirmé par l'analyse centésimale qui ne retrouve que 0,27 % de calcium.

II. 2. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE

II. 2. 1. Matériel et réactifs

- Spectrophotomètre infrarouge à transformée de FOURIER BRUKER IFS 48, couvrant l'intervalle des nombres d'onde compris entre 4000 et 400 cm^{-1} , équipé d'un détecteur "deutérium triglycine sulfate" et d'un passeur linéaire d'échantillon.

Le support informatique comprend un minicalculateur (Aspect 1000), un disque dur d'une capacité de 160 méga-octets, et une unité de disquette de 512 kilo-octets.

L'alimentation en air sec et exempt d'anhydride carbonique est réalisée par un sécheur d'air, type SANDER.

- Stéréomicroscope WILD M3Z (G x 6,5 à 40).

- Nécessaire à pastillage dans du bromure de potassium (pastille de 13 mm).

- Etuve MEMMERT U25, à circulation d'air.

- Presse hydraulique 16 TONNES BECKMAN 1012 A.

- Pompe à vide à palettes PROLABO Réf. 2179-12.

- Bromure de potassium Uvasol MERCK Réf. 4907.

- Bilirubinate de calcium neutre, acide et intermédiaire synthétisés précédemment.

- Bilirubine puriss FLUKA Réf. 14369.

II. 2. 2. Méthode

a- Préparation des échantillons

L'échantillon à analyser (environ 1mg) est broyé finement et de façon homogène au sein de 200mg de bromure de potassium dans un mortier en agate.

Le bromure de potassium est un solide transparent au rayonnement infrarouge de 4000 à 300 cm^{-1} .

La poudre obtenue est alors introduite dans un moule à pastiller, soumise pendant deux minutes à l'action d'une pompe à vide de manière à éliminer l'humidité résiduelle, et simultanément comprimée (pression de dix tonnes) pour obtenir une pastille fine et transparente.

b- Conditions d'enregistrement

La pastille est ensuite placée dans le compartiment échantillon de l'appareil et le spectre de 4000 à 400 cm^{-1} est enregistré en 40 secondes (résolution de l'appareil 1 cm^{-1} , nombre de spectres 128).

II. 2. 3. Spectres

II. 2. 3. 1. Produits purs

A chaque spectre est associé un tableau de pics précisant la position, l'intensité et la largeur de la bande à mi-hauteur des principaux pics, sachant que la sensibilité est de 80. Sont ainsi présentés successivement:

a - Bilirubine (figure 6 et tableau 5).

b - Bilirubinate de calcium acide (figure 7 et tableau 6).

c - Bilirubinate de calcium neutre (figure 8 et tableau 7).

d - Bilirubinate de calcium intermédiaire (figure 9 et tableau 8).

e - Polymère de bilirubine (figure 10 et tableau 9)

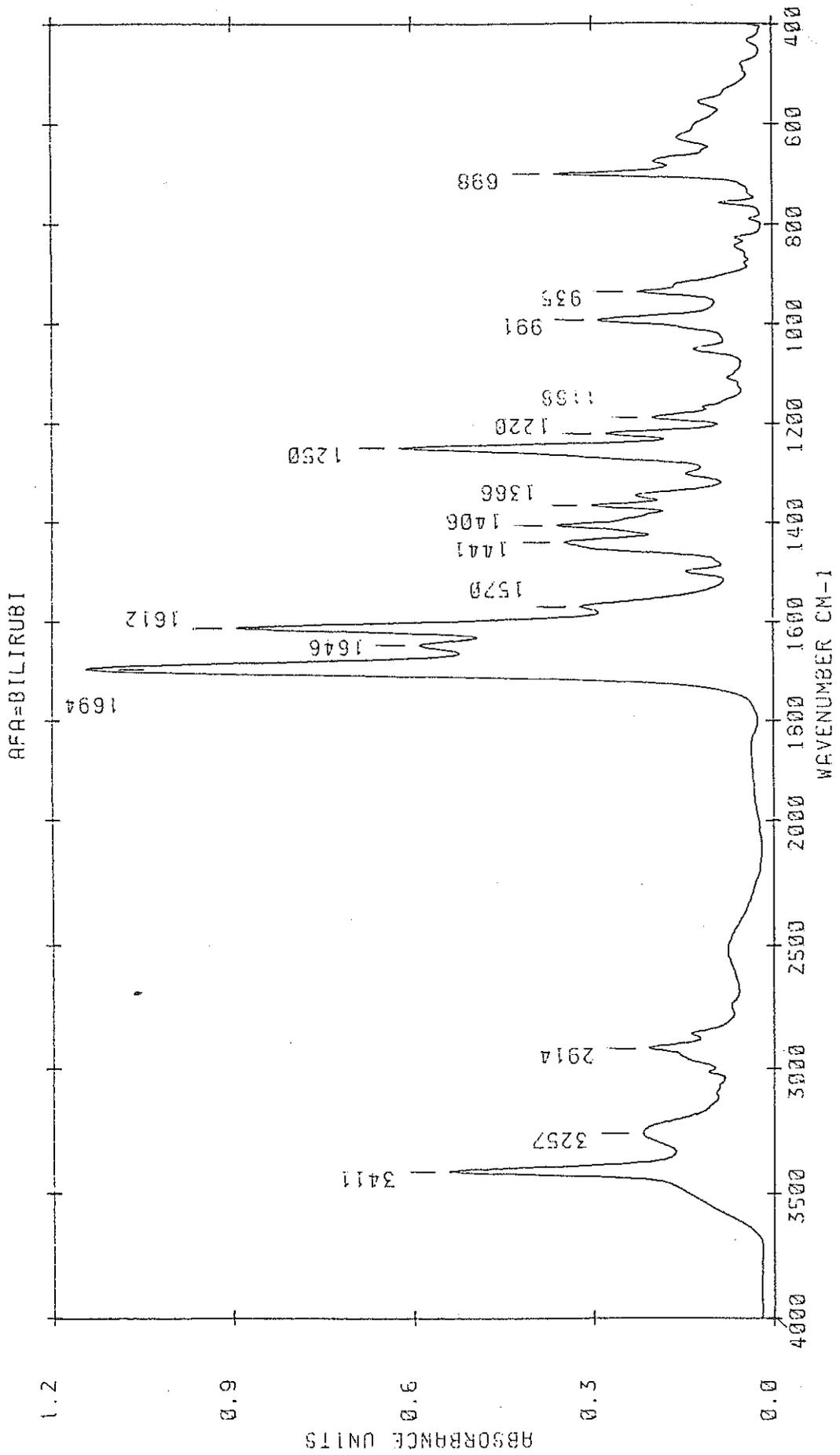


Figure 6: spectre infrarouge de la bilirubine

Tableau 5: pics de la bilirubine

N°	Nombre d'onde	Intensité relative	largeur de bande à mi-hauteur
1	433,00	2,10	15
2	555,50	9,19	59
3	626,80	12,36	70
4	673,10	15,81	35
5	698,20	30,81	13
6	757,00	6,21	10
7	789,80	1080,00	7
8	844,80	3,93	35
9	935,40	18,31	33
10	991,40	24,90	24
11	1051,10	10,00	26
12	1108,00	5,50	25
13	1188,10	16,32	23
14	1219,90	23,40	18
15	1249,80	53,69	24
16	1300,90	11,20	27
17	1344,30	18,56	28
18	1365,50	25,23	20
19	1406,00	30,31	25
20	1440,70	29,21	40
21	1499,60	11,16	22
22	1570,00	26,82	39
23	1612,40	77,84	27
24	1646,20	50,64	72
25	1694,40	100,00	39
26	2514,10	5,70	286
27	2914,30	16,78	90
28	3256,60	17,70	161
29	3410,90	46,58	47

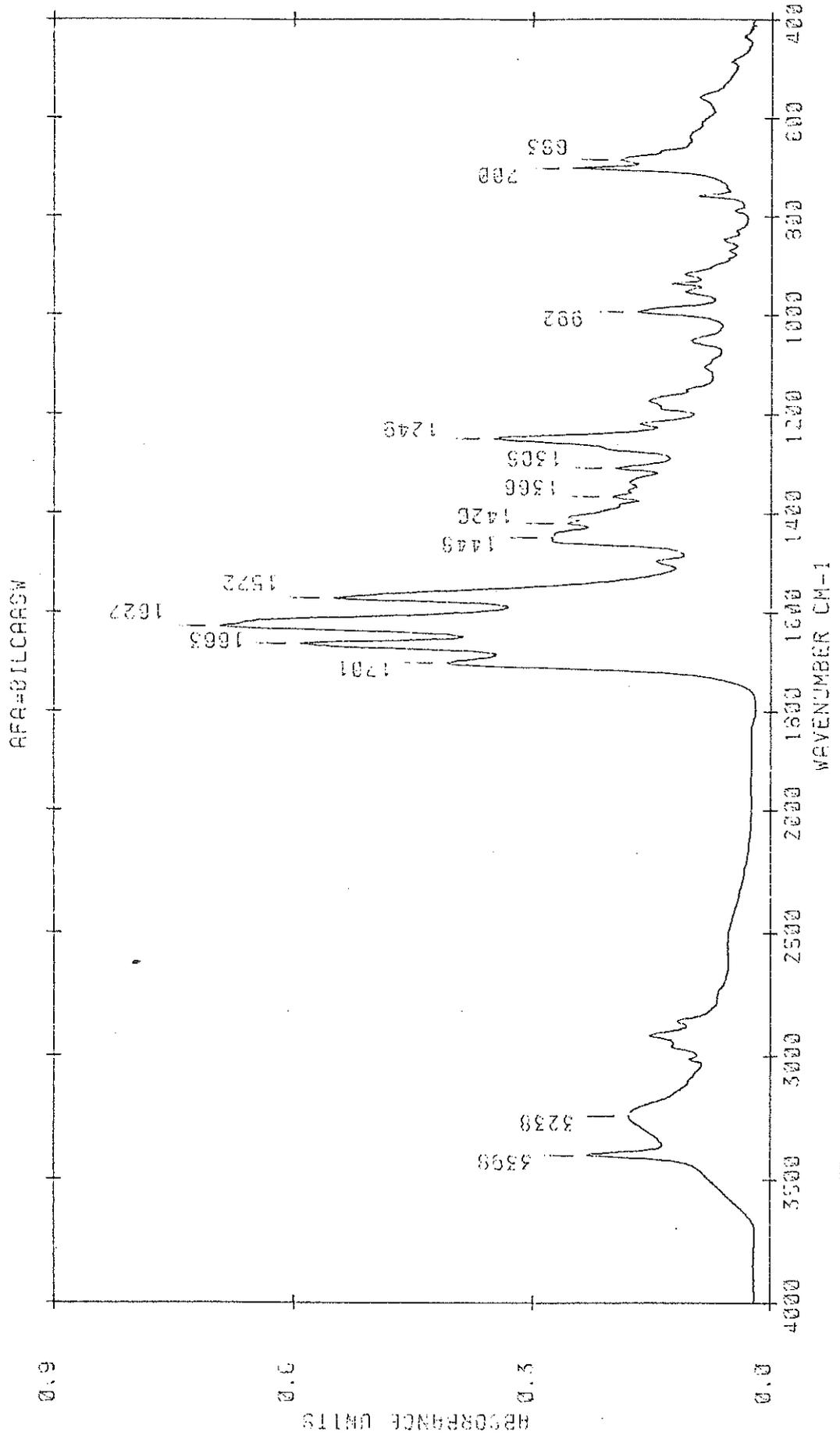


Figure 7: spectre infrarouge du bilirubinate de calcium acide

Tableau 6: pics du bilirubinate de calcium acide

N°	Nombre d'onde	Intensité relative	largeur de bande à mi-hauteur
1	555,50	10,68	41
2	682,80	24,98	54
3	700,10	34,23	15
4	757,00	10,78	12
5	787,90	4,10	13
6	846,70	6,15	23
7	917,10	13,37	34
8	936,40	15,74	14
9	951,80	13,27	24
10	992,30	22,60	23
11	1050,20	12,13	34
12	1104,20	9,74	74
13	1171,70	20,70	58
14	1218,90	21,64	27
15	1248,80	49,50	29
16	1307,70	26,90	23
17	1365,50	26,63	59
18	1407,00	35,10	57
19	1419,50	35,30	39
20	1418,50	38,24	44
21	1496,70	18,57	37
22	1571,90	78,91	37
23	1626,90	100,00	48
24	1662,50	85,80	33
25	1701,10	57,78	27
26	2856,40	14,63	131
27	2916,20	19,63	127
28	3238,30	23,60	206
29	3398,40	31,38	50

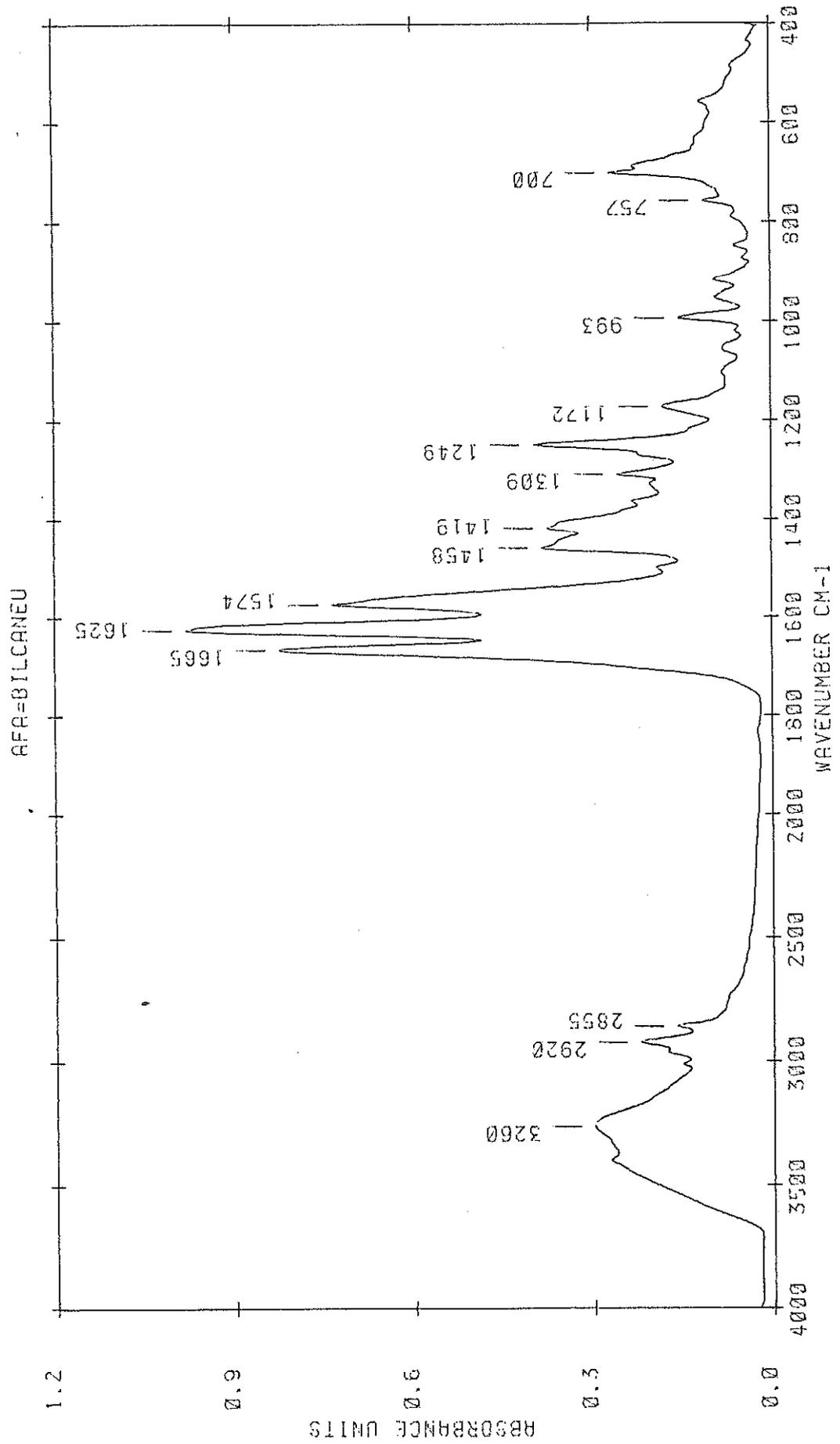


Figure 8: spectre infrarouge du bilirubinate de calcium neutre

Tableau 7: pics du bilirubinate de calcium neutre:

N°	Nombre d'onde	Intensité relative	largeur de bande à mi-hauteur
1	557,40	10,24	41
2	700,10	25,95	44
3	757,00	9,65	21
4	847,70	4040,00	17
5	873,70	3,50	16
6	916,10	7,99	23
7	951,80	7,77	38
8	993,30	14,40	19
9	1055,00	6,48	41
10	1171,70	16,87	41
11	1248,80	39,28	27
12	1308,60	24,82	30
13	1327,90	19,21	105
14	1363,60	22,32	42
15	1418,60	37,80	88
16	1458,10	37,97	25
17	1498,60	18,00	38
18	1573,80	74,47	70
19	1624,90	100,00	44
20	1665,40	83,66	41
21	2855,50	14,78	87
22	2920,10	21,20	72
23	3009,80	13,81	82
24	3259,50	29,18	274
25	3400,30	26,34	303

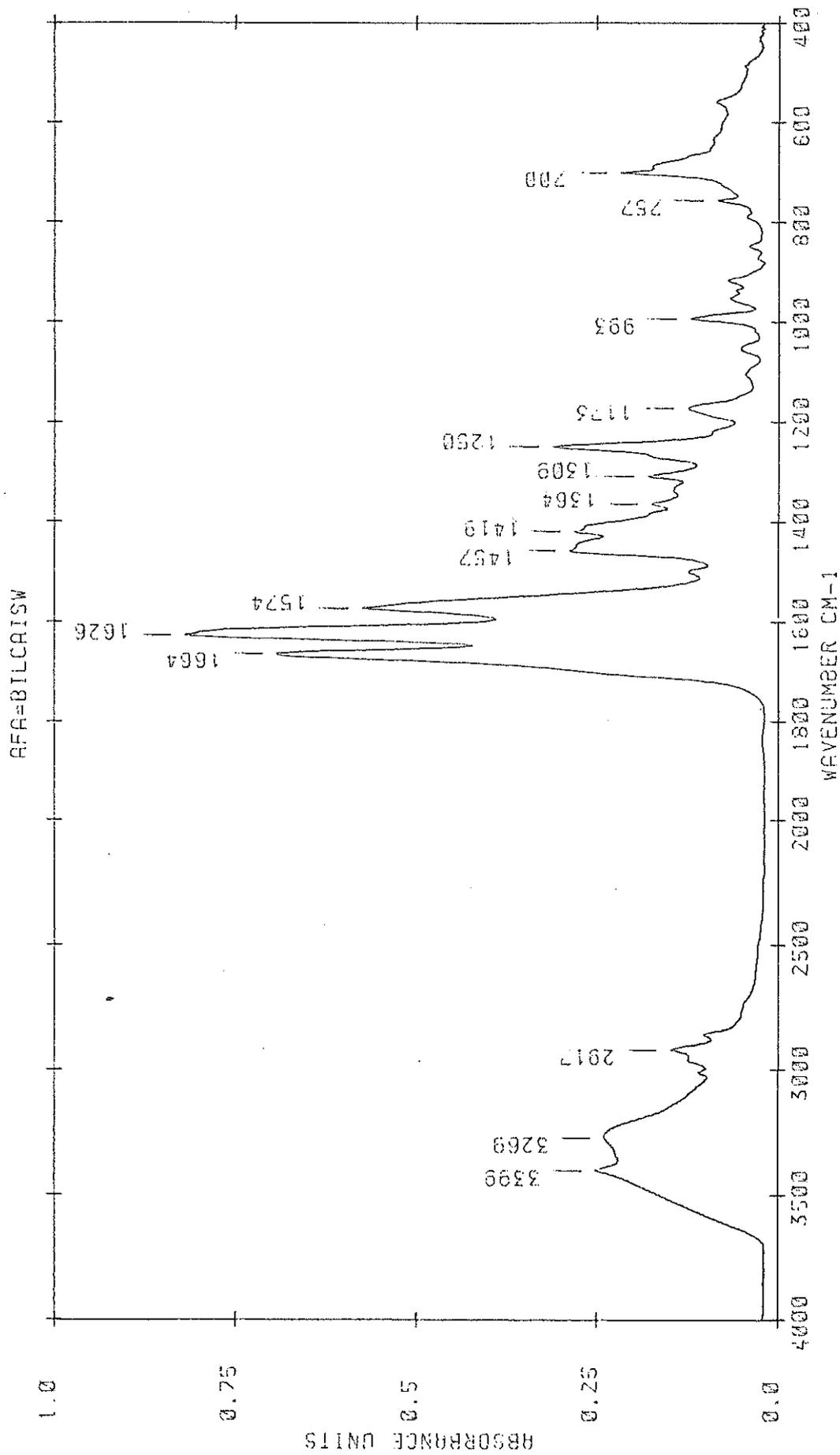


Figure 9: spectre infrarouge du bilirubinate de calcium intermédiaire

Tableau 8: pics du bilirubinate de calcium intermédiaire

N°	Nombre d'onde	Intensité relative	largeur de bande à mi-hauteur
1	557,40	8,36	37
2	686,60	19,40	58
3	700,10	24,70	17
4	757,10	8,40	14
5	788,80	3,15	19
6	848,60	2,67	14
7	871,80	1,22	15
8	917,10	6,43	19
9	937,40	5,30	16
10	952,80	5,98	27
11	933,30	12,62	18
12	1052,10	4,15	25
13	1104,20	3,40	34
14	1172,70	13,20	40
15	1249,80	36,49	24
16	1308,60	19,97	27
17	1337,60	15,74	133
18	1363,60	19,31	40
19	1419,60	32,65	76
20	1457,10	33,48	25
21	1498,60	13,16	43
22	1573,80	69,34	62
23	1625,90	100,00	44
24	1663,50	84,10	48
25	1840,00	0,43	43
26	2857,00	10,49	73
27	2917,20	16,20	94
28	3010,70	11,47	63
29	3269,10	27,61	261
30	3399,40	29,90	276

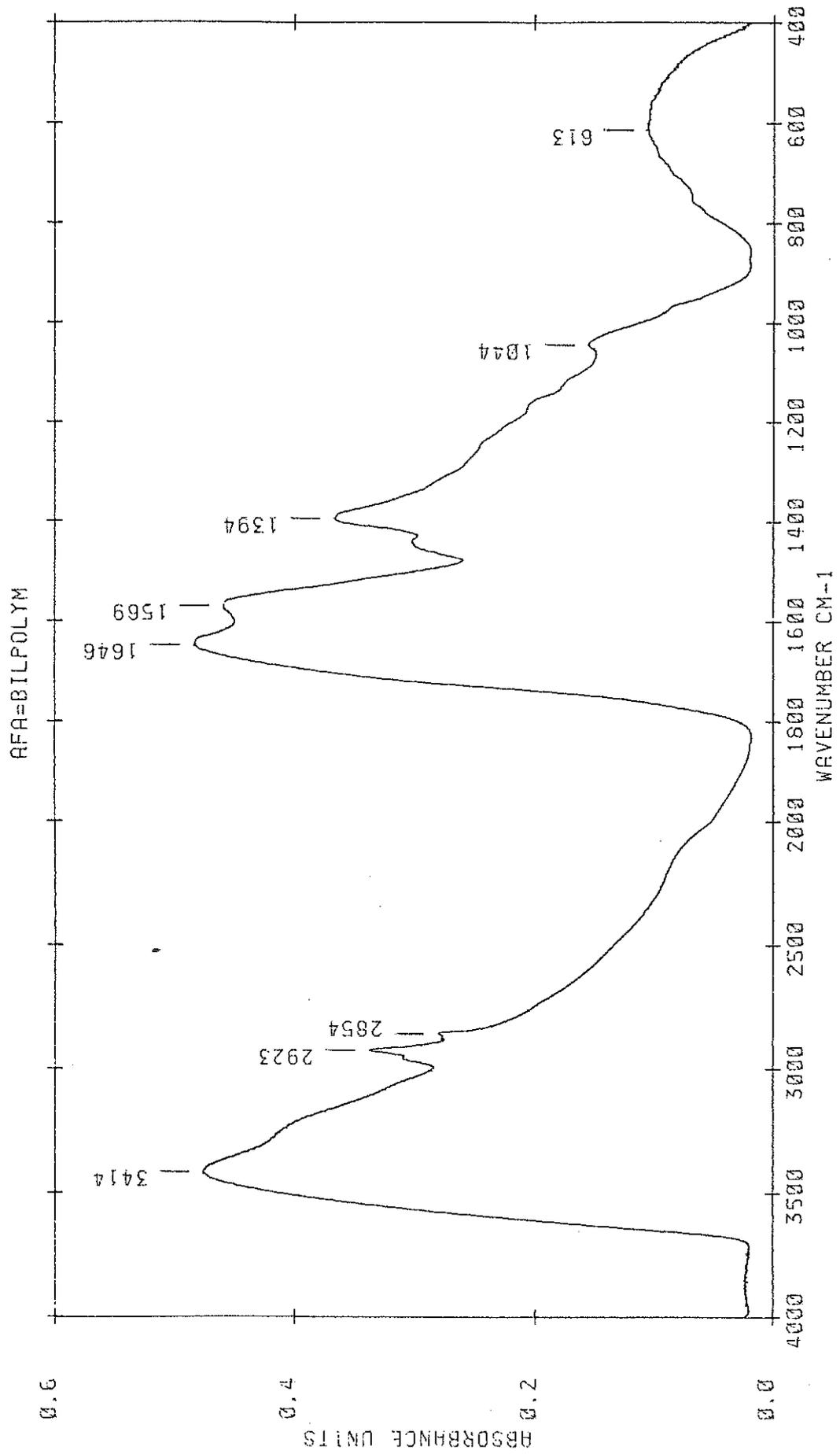


figure 10: spectre infrarouge du polymère de bilirubine

Tableau 9: pics du polymère de bilirubine

N°	Nombre d'onde	Intensité relative	largeur de bande à mi-hauteur
1	613,30	18,56	305
2	1044,40	29,19	147
3	1394,40	74,78	311
4	1439,80	60,81	193
5	1569,00	94,67	168
6	1646,20	100,00	166
7	2854,50	56,26	552
8	2923,00	68,50	126
9	3413,80	98,32	351

II 2. 3. 2. Mélanges binaires

Les spectres des divers mélanges binaires ont été construits mathématiquement à l'aide du logiciel ADAKOS ATS 89B (BRUKER) et vérifiés par la confection réelle de plusieurs mélanges. L'équation définissant un mélange à x % de bilirubine dans du bilirubinate de calcium neutre est:

$$\text{Mélange à x \%} = \text{Bi Ca Neu} - (- C^{\text{te}} \text{ de soustraction} \times \text{Bil}) + C^{\text{te}} \text{ d'addition.}$$

La constante d'addition est incrémentée entre chaque spectre de 0,05 unités de densité optique. Les valeurs de la constante de soustraction pour les divers pourcentages de bilirubine sont donnés dans le tableau 10, page suivante:

Tableau 10: Constante de soustraction pour divers pourcentages de bilirubine.

Pourcentage en bilirubine	Constante
2	0,0204
3	0,0309
4	0,0417
5	0,0526
6	0,0638
8	0,087
10	0,1111
15	0,1765
20	0,25
25	0,3333
30	0,4286
35	0,5384
40	0,6666
45	0,8182
50	1
55	1,2222
60	1,5
65	1,8571
70	2,3333
75	3
80	4
85	5,6666
90	9
95	19

**a - Mélange bilirubinate de calcium neutre /
bilirubine**

La figure 11 représente les spectres de mélanges en diverses proportions de bilirubine dans du bilirubinate de calcium neutre; on peut noter l'évolution de la bande OH libre à 3409 cm^{-1} .

**b- Mélange bilirubinate de calcium acide /
bilirubinate de calcium neutre.**

La figure 12 représente les spectres des mélanges à 10, 20, 30 et 40 % de bilirubinate de calcium neutre dans du bilirubinate de calcium acide. Le spectre supérieur, dont la position des pics en nombre d'onde est donné, est celui du bilirubinate de calcium neutre pur.

c- Mélange bilirubinate de calcium acide/ bilirubine

La figure 13 représente le spectre de ce mélange à des proportions différentes.

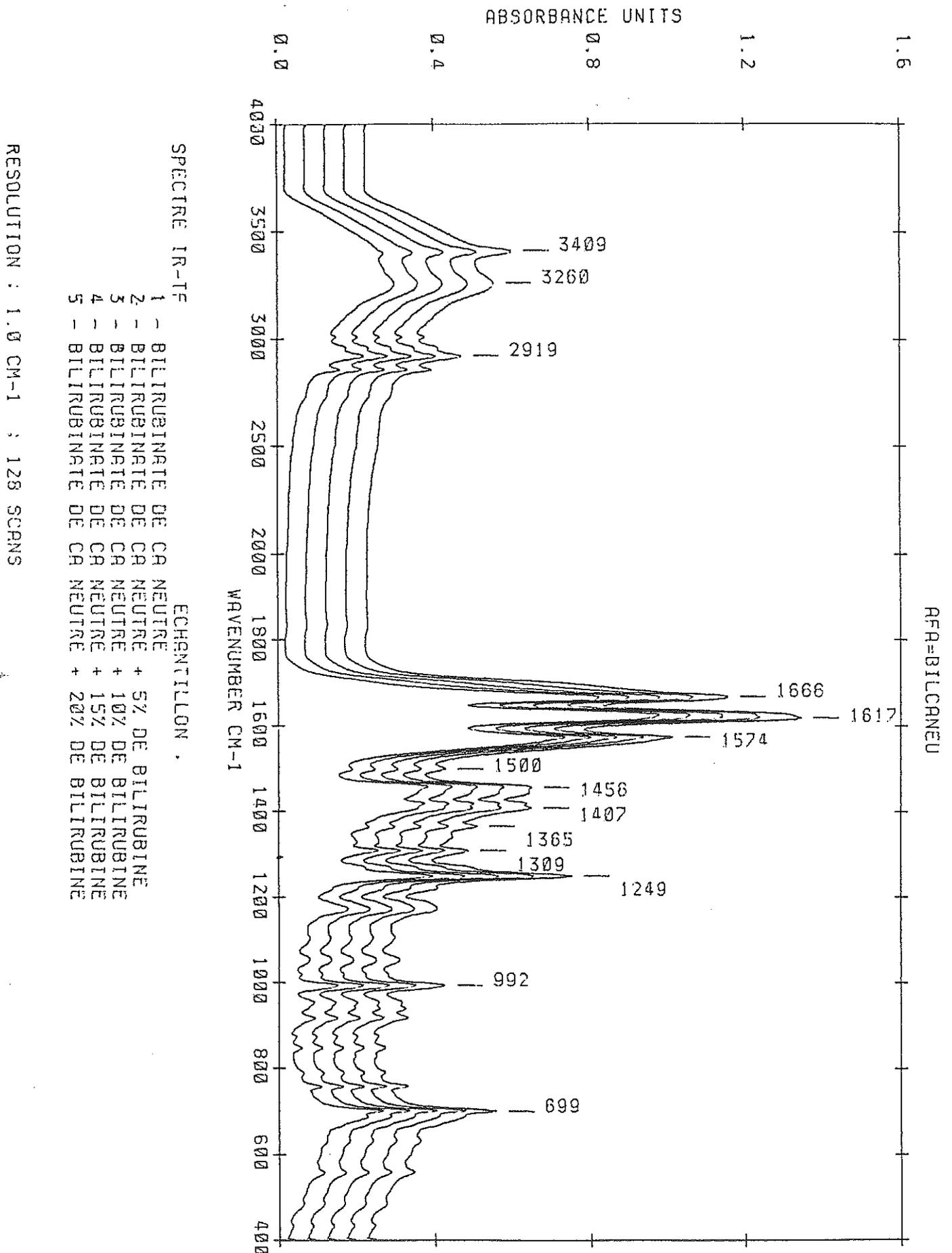


Figure 11: spectre infrarouge du mélange bilirubinate de calcium neutre/ bilirubine.

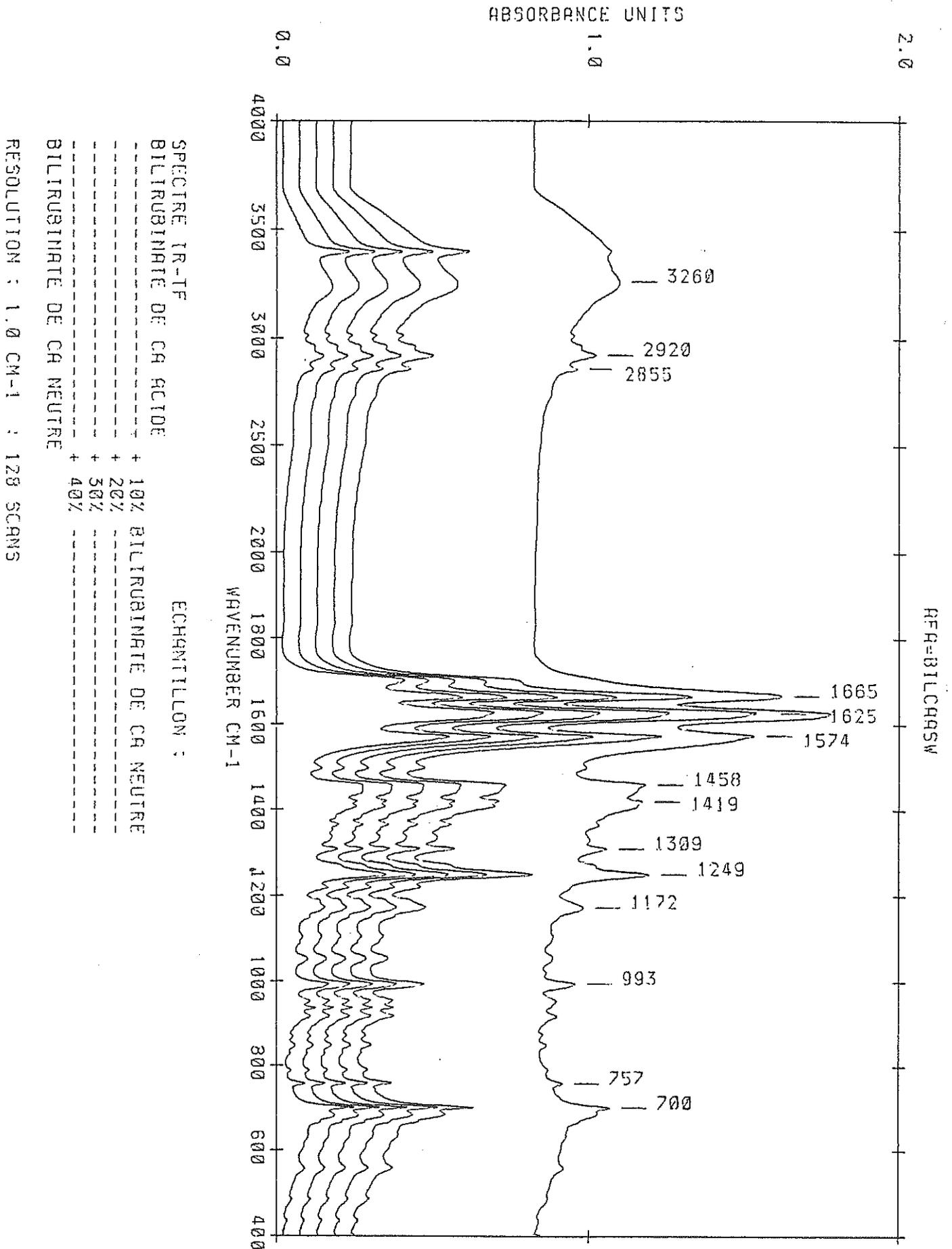


Figure 12: mélange bilirubinate de calcium acide/
bilirubinate de calcium neutre

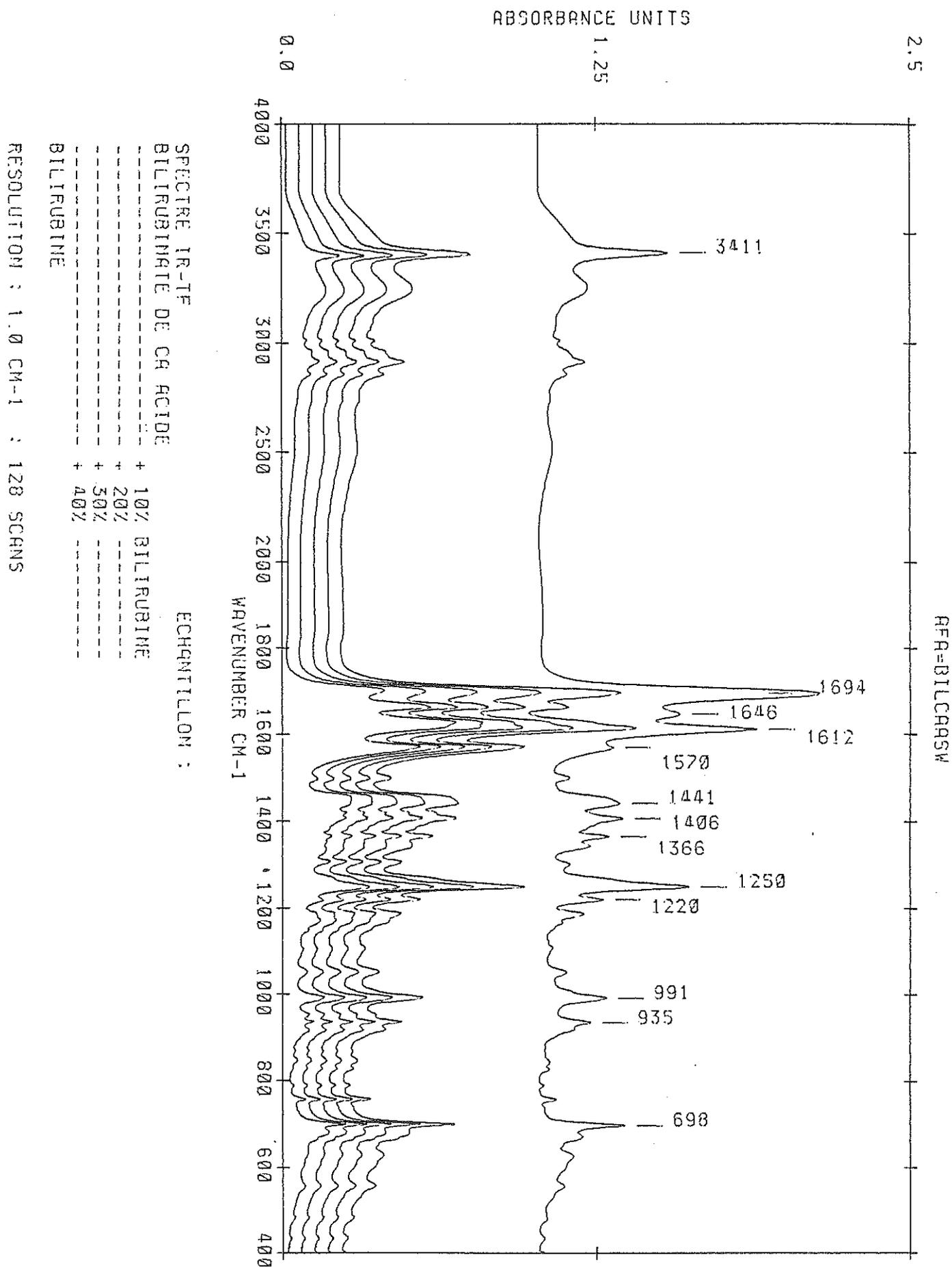


Figure 13: spectre infrarouge du mélange bilirubinate de calcium acide / bilirubine

II. 3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

II. 3. 1. Matériel et réactifs

- Butan-1-ol pour chromatographie Réf. MERCK 1988.
- Chloroforme Réf. MERCK 2445.
- Méthanol Réf. MERCK 6007.
- Phénol pour analyses Réf. MERCK 206.
- Ether de pétrole Ref. PROLABO 23837 360.
- Ethanol absolu pour analyses Réf. MERCK 983
- Acide acétique RP Normapur Réf. PROLABO 20104 298.
- Acétonitrile pour chromatographie Réf. MERCK 30.
- Plaques de Kieselgel 60 F₂₅₄ Réf. MERCK 5735.
- Lampe ultraviolette VL-6LC PROLABO émettant à 254 et 365 nm.

II.3.2. Méthode

Nous utiliserons ici la technique de la chromatographie sur couche mince. L'originalité de cette méthode tient au fait que la phase stationnaire est déposée en un film très adhérent de faible épaisseur (0,1 mm) sur une surface solide et rigide telle du verre, ou encore sur une feuille plastique souple, ce qui permet un découpage aisé.

Les phénomènes de séparation mis en oeuvre varient en fonction de la nature de la phase stationnaire qui fonctionne selon les cas soit comme une surface d'adsorption soit comme un support du liquide.

On identifiera une substance inconnue en comparant sa distance de migration avec celle de composés connus, déposés sur la même plaque.

La substance est caractérisée par son rapport frontal (Rf) qui correspond au rapport entre les longueurs parcourues par la substance considérée et par le front de solvant.

Les échantillons sont dissous dans un solvant aussi peu polaire que possible et très volatil; nous utiliserons le chloroforme.

Les échantillons sont déposés ponctuellement à l'aide de micropipettes à raison d'un volume de 0,75 à 2 μ l (concentrations voisines de 1%) sur une ligne horizontale et à deux centimètres du bord inférieur de la plaque. Ces dépôts sont séchés sous courant d'azote. La plaque ainsi préparée est introduite dans la cuve au fond de laquelle se trouve le solvant de migration.

II.3.3. Résultats

a - Recherche du solvant d'éluion

Notre objectif est de trouver le solvant adéquat qui permette de solubiliser et de séparer la bilirubine et ses sels, dans les meilleures conditions possibles.

Le tableau 11 représente les essais réalisés et les Rf obtenus pour la bilirubine.

Tableau 11: Recherche du solvant d'élution approprié

Solvant de migration	Composition v/v	Rf obtenus
Phénol 88% w/v pH 4,6	41 / 9	spot sous forme d'une traînée dans le front du solvant
Chloroforme-méthanol-eau	48 / 9 / 1	dans le front du solvant
Ether de pétrole-éthanol-acide acétique	79 / 20 / 1	Rf = 0,095
Chloroforme-méthanol-acide acétique-eau	50 / 30 / 8 / 4	dans le front du solvant
Acétonitrile		dans le front du solvant
Chloroforme		Rf = 0,23
Méthanol		dans le front du solvant
Butan-1-ol		Rf = 0,73
Chloroforme-méthanol	40 / 10	dans le front du solvant
Chloroforme-méthanol	95 / 5	dans le front du solvant
Chloroforme-méthanol	20 / 1,0	dans le front du solvant
Chloroforme-méthanol	20 / 0,70	Rf = 0,89
Chloroforme-méthanol	20 / 0,50	Rf = 0,88
Chloroforme-méthanol	20 / 0,25	Rf = 0,72

En théorie le front de solvant n'est représenté que par une ligne; la pratique est toute autre, on a plutôt à faire à une bande ou front de démixtion, dans lequel sont inexploitable tous les spots qui s'y trouvent.

Nous éliminerons le choix du butan-1-ol comme solvant de migration, bien que le Rf de la bilirubine soit de 0,73 et qu'il n'y ait pas de démixtion (puisqu'il n'y a pas de mélange de solvant), car le butan-1-ol a tendance à fixer le dépôt et à l'empêcher de migrer.

Ainsi, d'après les résultats obtenus nous utiliserons plutôt comme solvant de migration 20 ml de chloroforme mélangés à 0,25 ml de méthanol. Dans ce cas le bilirubinate de calcium ne migre pratiquement pas et pour la bilirubine nous obtenons un Rf de 0,72.

b - Chromatographie de la bilirubine et de ses sels

A l'aide du solvant d'élution chloroforme-méthanol (20 / 0,25), nous avons réalisé la chromatographie de:

* la bilirubine et le bilirubinate de calcium neutre (BiCaNeu):

Bilirubine: Rf = 0,64 spot jaune-orangé devenant vert par oxydation

BiCaNeu: Rf = 0,00 pas de migration

* la bilirubine et le bilirubinate de calcium acide (BiCaAc):

Bilirubine: Rf = 0,65 spot jaune orangé devenant vert par oxydation

BiCaAc Rf = 0,00 nous n'observons pas de migration

* la bilirubine et le sel intermédiaire (BiCaInt):

Bilirubine: Rf = 0,66 spot jaune-orangé devenant vert par oxydation

BiCaInt: Rf = 0,00 aucune migration n'est observée

En conclusion de ce chapitre sur la partie expérimentale de notre travail, nous pouvons affirmer que nous avons bien obtenu les trois bilirubines de calcium et le polymère de bilirubine. Leur pureté est correcte, comme en témoignent les données de l'analyse centésimale, infrarouge et chromatographique.

TROISIEME PARTIE:

DISCUSSION

ET

APPLICATION

III.1. DISCUSSION

La spectrophotométrie infrarouge à transformée de FOURIER est une méthode d'analyse précise et rapide des calculs biliaires, à condition de posséder une spectrothèque complète des différents constituants lithiasiques. L'objet de ce travail était précisément de compléter la collection de spectres dont nous disposions au laboratoire (67, 68) en lui adjoignant les spectres IR des divers composés de nature pigmentaire. Mais avant d'appliquer les résultats que nous avons obtenus à l'analyse de calculs biliaires ou de dépôts obstruant les endoprothèses biliaires, il est nécessaire de faire une comparaison précise des divers spectres IR obtenus afin de cerner les limites de la méthode.

III.1.1. Limites de l'analyse infrarouge

Il est aisé de constater que les spectres IR des sels de calcium de la bilirubine ne sont pas sans similitudes avec celui de la bilirubine elle-même. Pour différencier ces spectres, les pics dont la position ou l'intensité varient doivent être systématiquement repérés.

SUTOR et WILKIE (13) avaient porté leur intérêt sur la bande de vibration de valence $C=O$, qui apparaît pour le sel acide à 1701 cm^{-1} , qui n'est matérialisée que par un épaulement pour le sel intermédiaire et qui disparaît pour le sel neutre. Cette bande présente en effet un grand intérêt analytique pour différencier les bilirubines de calcium entre-eux, mais ne permet pas, à elle-seule, la différenciation entre bilirubine libre et bilirubinate acide de calcium dans les mélanges pigmentaires retrouvés dans les calculs. Aussi avons-nous porté notre intérêt également sur les bandes des

vibrations de valence O-H dans la zone 3200-3500 cm^{-1} (Figure 14) qui présentent un intérêt analytique remarquable puisque 13 cm^{-1} séparent les maxima d'absorption des pics O-H libres et que les bandes O-H liées sont déplacées de 150 cm^{-1} vers les bas nombres d'onde.

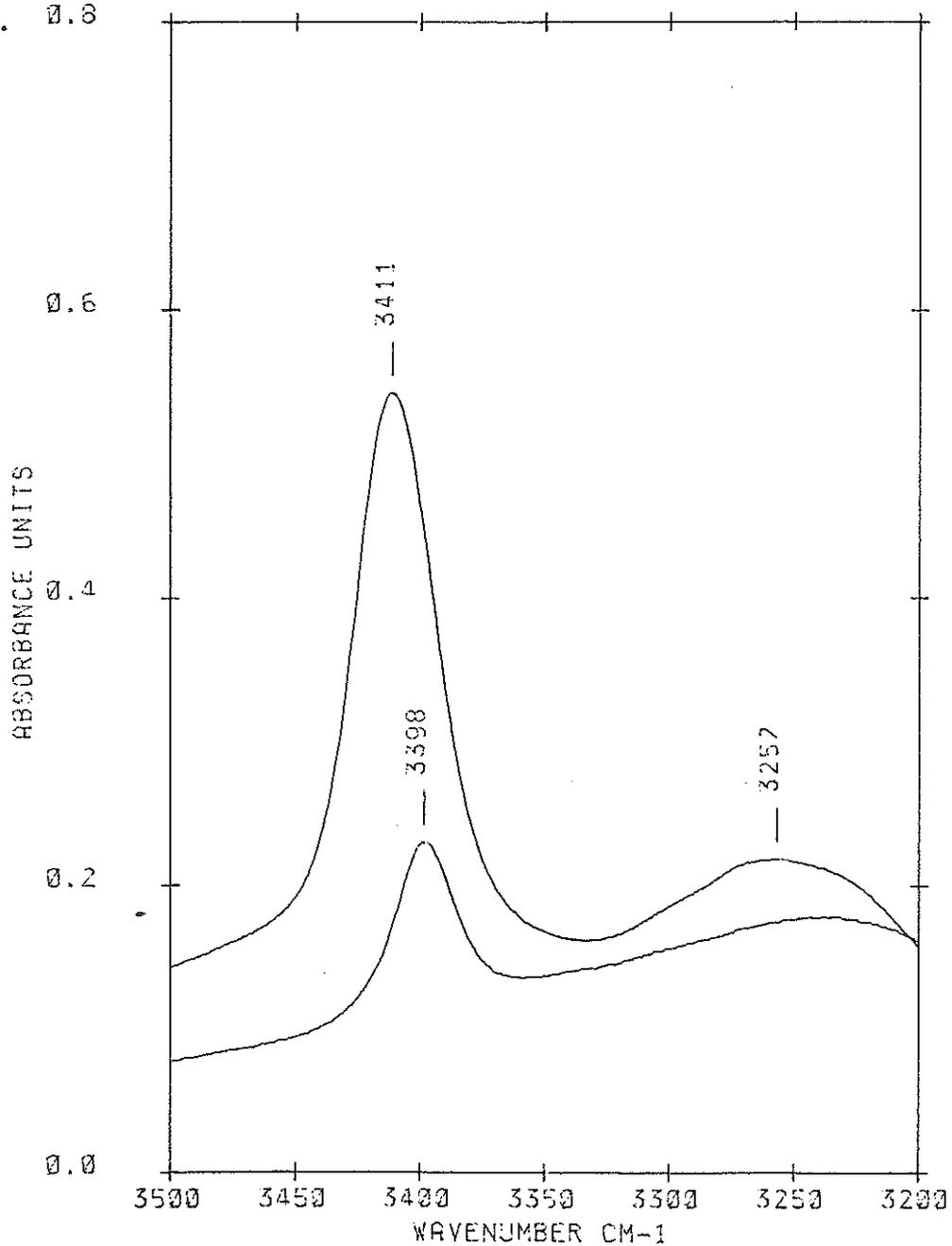


Figure 14: position de la bande νOH libre pour la bilirubine (spectre supérieur 3411 cm^{-1}) et pour le bilirubinate de calcium acide (spectre inférieur 3398 cm^{-1}).

Néanmoins une réelle difficulté d'interprétation des spectres existe lorsque nous sommes en présence de mélanges binaires bilirubine-bilirubinate de calcium. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé ces mélanges dans la partie expérimentale. La présence de la bande $\nu_{C=O}$ vers 1700 cm^{-1} ne permet pas dans ce cas une analyse différentielle et seul un pointage des maxima d'absorption des vibrations ν_{O-H} libres ou liés par liaisons hydrogènes permet l'analyse (tableau 12 et figure 15).

Tableau 12: position en cm^{-1} des bandes de vibration de valence O-H pour des mélanges binaires bilirubine-bilirubinate de calcium neutre (Bi-Bi Ca Neu) et bilirubine-bilirubinate de calcium acide (Bi-Bi Ca Ac).

Bilirubine % w/w	mélange Bi-Bi Ca Neu	mélange Bi-Bi Ca Ac	
	OH libre	OH libre	OH lié
0	3400,30	3398,40	3238,30
3	3401,30	3398,40	3239,00
5	3402,70	3398,90	3240,00
10	3405,60	3399,40	3241,20
15	3408,00	3400,30	3242,10
20	3409,00	3401,30	3244,20
30	3410,00	3402,70	3247,10
40	3410,50	3405,10	3250,00
50	3410,90	3407,00	3253,00
60	3410,90	3409,00	3253,70
70	3410,90	3410,00	3253,90
80	3410,90	3410,50	3254,80
90	3410,90	3410,90	3256,00
100	3410,90	3410,90	3256,60

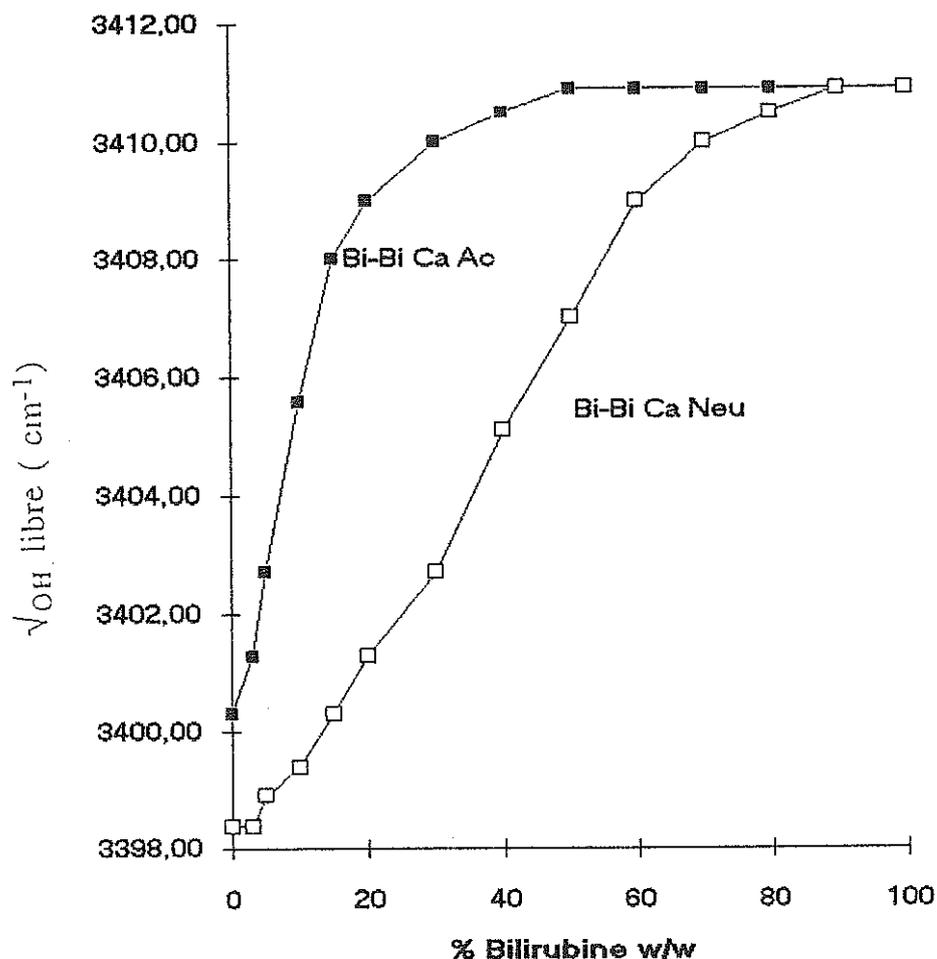


Figure 15: Déplacement du maximum d'absorption de la bande ν_{OH} libre pour les mélanges entre la bilirubine (Bi) et les bilirubinate de calcium neutre (BiCaNeu) et acide (BiCaAc).

L'étude des courbes de la figure 15 montre que la vibration ν_{OH} libre se déplace de 3398 à 3411 cm^{-1} . Dès lors que cette bande se situe à une fréquence supérieure à 3401 cm^{-1} , la présence de bilirubine dans un calcul est quasi-certaine; le pourcentage pondéral en bilirubine est lu sur les abaques et le choix entre les mélanges avec les sels neutre ou acide est guidé par la position de la vibration OH liée qui culmine entre:

- 3257 et 3260 cm^{-1} pour le bilirubinate de calcium neutre
- 3238 et 3257 cm^{-1} pour le bilirubinate de calcium acide.

exemple: spectre IR d'un calcul présentant des maxima d'absorption à 3406 et 3259 cm^{-1} :

La bande à 3406 cm^{-1} indique la présence de bilirubine et peut correspondre à un mélange:

A - bilirubine (12%) - bilirubinate de calcium neutre (88%)

B - bilirubine (45%) - bilirubinate de calcium acide (55%)

Le mélange B devrait présenter (tableau 12) une bande O-H liée à 3251-2 cm^{-1} et non à 3259 cm^{-1} . Le calcul contient donc 12% de bilirubine dans du bilirubinate de calcium neutre.

Dans le cas où la bande O-H libre se situe entre 3399 et 3401 cm^{-1} , une incertitude sur la présence de la bilirubine existe. Il est alors délicat de trancher entre un mélange bilirubine (5 à 15%) - bilirubinate de calcium neutre ou acide et un mélange bilirubinate de calcium acide - bilirubinate de calcium neutre (tableau 13).

Tableau 13: position en cm^{-1} des bandes de vibration de valence O-H du mélange binaire bilirubinate de calcium acide-bilirubinate de calcium neutre.

Bilirubinate de Ca acide % w/w	ν OH libre	ν OH lié
0	3400,3	3259,5
10	3399,8	3257,6
20	3399,2	3256
30	3398,6	3254,4
40	3398,4,	3252,7
50	3398,4,	3250
60	3398,4,	3247
70	3398,4,	3246
80	3398,4,	3244,4
90	3398,4,	3240,3
100	3398,4,	3238,3

exemple: Pour le spectre infrarouge d'un calcul présentant des maxima d'absorption à 3400 et 3258 cm^{-1} :

Il est délicat au vu des spectres IR de trancher entre un mélange:

- bilirubine (0 à 5%) - bilirubinate de calcium neutre
- bilirubinate de calcium acide (0 à 5%) - bilirubinate de calcium neutre.

Le choix est d'autant plus délicat que le maximum d'absorption de la vibration OH liée peut être déplacé par la présence de mucoprotéines. Dans ce cas, l'ambiguïté peut être levée

par une étude chromatographique d'un extrait chloroformique du calcul.

III.1.2. Etude chromatographique sur couche mince

Dans les cas particuliers précisés et en seconde intention, une étude chromatographique du calcul biliaire peut permettre de confirmer la présence de bilirubine. Au terme de notre partie expérimentale, nous avons finalement sélectionné comme solvant d'éluion le mélange chloroforme/méthanol 20/0,25.

A l'usage, on observe un manque de régularité dans les distances de migration, les valeurs de Rf observées s'étalant de 0,73 à 0,64. Ces variations peuvent être expliquées:

- par des effets de bord: nous avons en effet utilisé des plaques de faibles largeur, accélérant par effet de bord la vitesse de migration de la bilirubine;
- par une saturation incomplète de l'atmosphère de la cuve par le solvant;
- par l'absence de préconditionnement des plaques qui aurait permis un contrôle précis de l'activité du gel de silice.

C'est la raison pour laquelle il est préférable de réaliser toutes les chromatographies en regard de bilirubine de référence. On peut aussi noter un verdissement rapide du spot de bilirubine après migration; ce changement de couleur est lié à l'oxydation à l'air de la bilirubine en biliverdine.

III.2. APPLICATION

La validité de notre démarche expérimentale a été confirmée par l'analyse d'une part de calculs biliaires, d'autre part de dépôts obstruant les endoprothèses biliaires.

III.2.1. Analyse de calculs biliaires

Plusieurs calculs de type pigmentaire brun ou noir ont été analysés. Les résultats de leur analyse semi-quantitative par spectrophotométrie infrarouge sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Aspect extérieur et composition en pourcentage du poids sec de 8 calculs pigmentaires, déterminée par spectrométrie infrarouge (Bi Ca Ac : bilirubinate de calcium acide; Bi Ca Neu : bilirubinate de calcium neutre).

Calcul n°	76	78	83	88	91	96	97	98
Bi Ca Ac	50	20	60	40	60	65	40	
Bi Ca Neu		15		30		10	40	
Palmitate Ca	15	3	5		20	5	5	
Protéines	30		20	10	10	10	15	10
Calcite		2	10		10			60
Aragonite	traces			20		10		
Vatérite								30
Cholestérol	traces	50	5			traces		
Phosphates Ca		10						

En aucun cas nous n'avons décelé sur les spectres infrarouges, la présence de bilirubine; une vérification par analyse complémentaire chromatographique a pratiquement confirmé ce résultat: seul un spot jaune fugace, disparaissant en quelques secondes, a été noté pour quelques calculs. Ces calculs étant prélevés en milieu biliaire, on peut logiquement penser qu'ils peuvent être potentiellement souillés par de la bile, donc par une trace de bilirubine exogène.

III.2.2. Analyse d'endoprothèses biliaires

L'étiopathogénie et la prévention des occlusions des endoprothèses biliaires (figure 17), nécessite une connaissance précise de la nature des dépôts obstructifs (23). Nous avons ainsi analysé les dépôts obstruant sept endoprothèses par spectrophotométrie infrarouge (figure18). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 15.

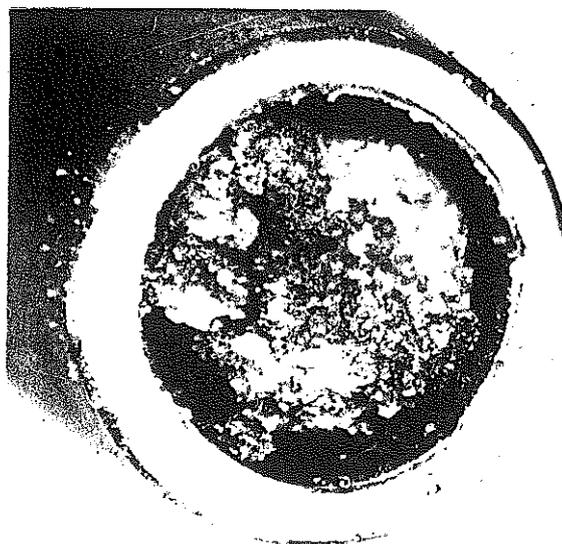


Figure 17: photographie d'une endoprothèse obstruée. Vue en coupe transversale.

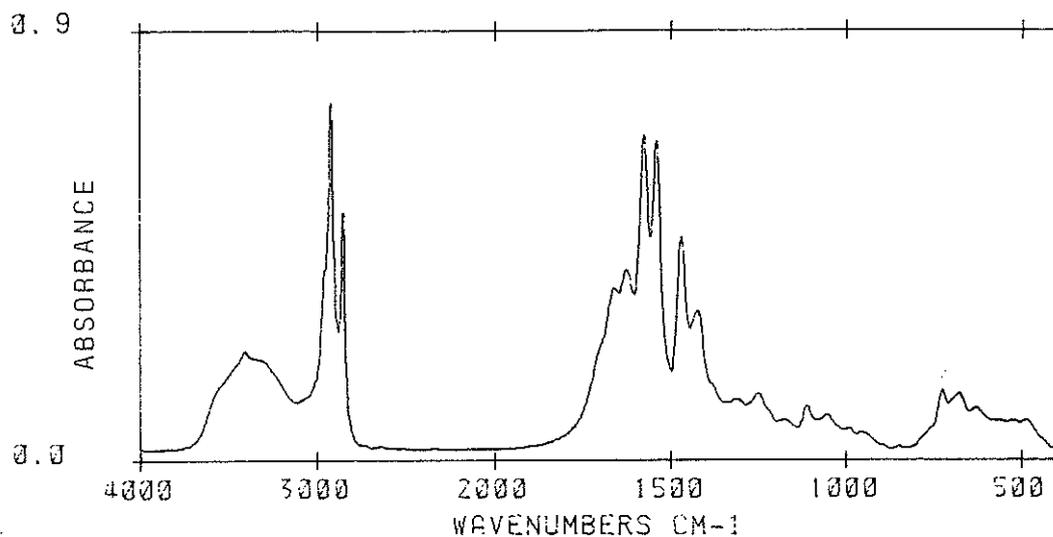


Figure 18: spectre infrarouge d'une endoprothèse biliaire.

Tableau 15: Composition chimique des dépôts obstruants
7 endoprothèses biliaires. Détermination par spectrométrie
infrarouge.

N°	1	2	4	6	8	11	19
Palmitate Ca	50	5	50	70	15	5	35
Bil Ca Neu	20	30	25	10	10	40	10
Bilirubine libre		5			5		
Protéines	10	15	5	10	15	15	10
Cholestérol	traces		10				5
PO ₄	10	10		traces	traces	traces	
Bil Ca Ac	10	35	10	10	55	40	40

Comme pour les calculs biliaires, l'analyse infrarouge a été complétée par une étude chromatographique qui a confirmé la présence de traces de bilirubine dans les prothèses 2 et 8. Il faut savoir cependant que les endoprothèses ne sont pas nettoyées après prélèvement pour être envoyées en microbiologie, donc nous pouvons avoir décelé un apport exogène de bilirubine libre.

CONCLUSION

CONCLUSION:

La spectrophotométrie infrarouge à transformée de FOURIER est une méthode d'analyse précise de la composition physicochimique des calculs pigmentaires. Elle est rapide et permet une bonne estimation quantitative des divers constituants des calculs. Néanmoins, comme nous l'avons montré dans ce travail, dans certains cas l'analyse infrarouge gagne à être complétée par une analyse chromatographique sur couche mince. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence de la bilirubine libre dans les calculs pigmentaires, mais seulement à l'état de traces qu'il semble logique d'attribuer à une contamination de la surface du calcul par de la bile. L'analyse de calculs biliaires pigmentaires et de dépôts obstruant des endoprothèses a montré la présence des divers sels de calcium de la bilirubine, mais aussi d'autres composés.

Au vu de ces résultats les classifications actuelles des calculs biliaires-semblent présenter des lacunes. Nous avons par exemple pu observer des calculs d'apparence pigmentaire noire, ne contenant pratiquement pas de pigments biliaires, et majoritaires en carbonates de calcium. L'aspect extérieur serait-il donc un élément nécessaire mais non suffisant pour appréhender l'étiopathogénie et la composition de ces calculs? Ne serait-il pas nécessaire d'adopter une nouvelle classification?

BIBLIOGRAPHIE

BIBIOGRAPHIE:

1 - SOLOWAY R.D., TROTMAN B.W., OSTROW J.D.

Pigment gallstones.

Gastroenterology, 1977, 72, 167-182.

2 - BOGREN H.

The composition and structure of human gallstones.

Acta Radiol. , Supplementum 226, 1964, 1-47.

3 - MAKI T.

Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone.

Ann. Surg. , 1966, 164, 90-100.

4 - CETTA F. M.

Bile infection documented as initial event in pathogenesis of brown pigment biliary stones.

Hepatology, 1986 , 6, 482-489.

5.- RAJAGOPAL U, MATUR S. K. , KARTHA V. B. , PRASAD G. E.

Pigment calculi: structure and composition.

Indian J. Gastroenterol. , 1988, 7 , 9-11.

6 - TROTMAN B. W.

Formation of pigment gallstones .

In Gallstones, COHEN S., SOLOWAY R.D., Churchill Livingstone, ;

New York ,1985, 299-304.

7 - TROTMAN B.W. , SOLOWAY R.D.

Pigment vs cholesterol cholelithiasis: clinical and epidemiological aspects.

Am. J. Dig. Dis., 1975, 20, 735.

8 - ERLINGER S.

Physiopathologie, épidémiologie, et histoire naturelle de la lithiase biliaire.

Encycl. Med. Chir. (Paris, France), Foie - Pancréas, 7047 A¹⁰ , 9 - 1986, 10p.

9 - POTAMIS G.S.

Molecular organisation of gallstones.

Dig. Dis. Sci., 1987, 32 (3), 332-334.

10 - SANJO T.

Biochemical and histochemical study on fatty acid-calcium gallstones.

Tohoku J. Exp. Med., 1970, 101, 237-249.

11 - EDWARDS J.D., WILBERT D.A., HALPERT B.

Infrared spectrums of human gallstones.

Am. J. Clin. Pathol., 1958, 29, 236-238.

12 - MAKI T., SATO T., SUZUKI N.

On *in vitro* synthesis of calcium bilirubinate.

Tohoku J. Exp. Med., 1964, 82, 117-123.

13 - SUTOR D. J., WILKIE L. I.

The crystalline salts of calcium bilirubinate in human gallstones.

Clin. Sci. Mol. Med., 1977, 53, 101-103.

14 - COWIE A. G. A. , SUTOR D. J., WOOLEY S. E., CLARCK C. G.

The calcium palmitate gallstone.

Brit. J. Surg., 1973, 60 (1), 16-18.

15 - WOSIEWITZ U. , SCHROEBLER S.

On the chemistry of "black" pigment stones from gallbladder.

Clin. Chim. Acta, 1978, 89, 1-12.

16 - MAKI T., MATSUSHIRO T., SUZUKI N.

Clarification on the nomenclature of pigment gallstones.

Am. J. Surg., 1982, 144, 302-305.

17 - OSTROW D.

The etiology of pigment gallstones.

Hepatology, 1984, 4 (5), 215S-222S.

18 - Geigy Scientific Tables, Bile.

Ciba-Geigy limited, Basle, 1981, 139-144.

19 - MASUDA H. , NAKAYAMA F.

Composition of bile pigment in gallstones and bile and their etiological significance.

J. Lab. Clin. Med., 1979, 93, 353-360.

20 - AKIYOSHI T., NAKAYAMA F.

Bile acid composition in brown pigment stones.

Dig. Dis. Sci., 1990, 35, 27-32.

21 - BONNET R., DAVIES J.E., HURSTHOUSE H.B.,
SHELDRIK G.M.

The structure of bilirubin.

Proc. R. Soc. Lond. B., 1978, 202, 249-268.

22 - TABATA M., NAKAYAMA F.

Bacteria and gallstones etiological significance.

Dig. Dis. Sci., 1981, 26, 218-224.

23 - MOESCH C., SAUTEREAU D., CESSOT F., BERRY P.,
MOUNIER M., GAINANT A., PILLEGAND B.

Physicochemical and bacteriological analysis of the contents of occluded biliary endoprotheses.

Hepatology, 1991, 14, 1142-1146.

24 - PITT H. A., BERQUIST W.E., MANN L.L., PORTER-FINK V.,
FONKALSRUD E.W., AMENT M.E., DEBESTEN L.

Parenteral nutrition induce calcium bilirubinate gallstones.

Gastroenterology, 1983, 84, 1274.

25 - TROTMAN B. W.

Insight into pigment gallstones diseases.

J. Lab. Clin. Med., 1979, 93, 349-352.

26 - STROM B. L., WEST S. L.

The epidemiology of gallstones disease.

In Gallstones, COHEN S., SOLOWAY R.D., Churchill Livingstone, ;
New York, 1985, 1-26.

27 - HO K.J., HSU S.C., CHEN O.S., HO L.H.

Human biliary β -glucuronidase: correlation of its activity with
deconjugation of bilirubine in the bile.

Eur. J. Clin. Invest. , 1986, 16, 361-367.

28 - ALVARO D., ANGELICO M., GANDIN C., CORRADINI S.G.,
CAPOCACCIA L.

Physico-chemical factors predisposing to pigment gallstone formation in
liver cirrhosis.

J. Hepatol., 1990, 10, 228-234.

29 - SUZUKI N., NAKAMURA Y., KOBAYASHI N., SATO T.

On metal element in pure pigment gallstones

Tohoku J. Exp. Med., 1975, 116, 233-240.

30 - WOSIEWITZ U., SCHROEBLER S.

Solubilisation of unconjugated bilirubine by bile salts.

Experientia, 1979, 35, 717.

31 - LAMONT J.T., VENTOLA A.S., TROTMAN B.W.,
SOLOWAY R.D.

Mucin glycoprotein content of human pigment gallstones.

Hepatology, 1983, 3, 377-382.

32 - LEUSCHER U., WURBS D., BAUMGÄRTEL H.

Alternating treatment of common bile duct stones with a modified glyceryl- 1-monooctanoate preparation and in bile acid-EDTA solution by nasobiliary tube.

Scand. J. Gastroenterol, 1981, 16, 497-503.

33 - REGE R.V., NAHRWOLD D.L., MOORE E.W.

Absorption of biliary calcium from the canine gallbladder: protection against the formation of calcium-containing gallstones.

J. Lab. Clin. Med., 1987, 110 (4), 381-386.

34 - MOORE E.W.

The role of calcium in the pathogenesis of gallstones: Ca⁺⁺ electrode studies of model bile salt solution and other biologic systems.

Hepatology, 1984, 4, 228-243.

35 - ANANTHAKRISHNAN N., BALKRISHNA RAO B. N.,

KAPUR B.M.L.

Studies of gallstone composition: IV. analysis of gallstones by microchemical methods.

Indian J. Med. Res., 1975, 63(6), 810-817.

36 - NAKAYAMA F.

Quantitative microanalysis of gallstones.

J. Lab. Clin. Med., 1968, 72, 602-611.

37 - DAUDON M., PORTAT M.F., REVEILLAUD R.J.

Analyse des calculs par spectrophotométrie infrarouge. Avantages et limites de la méthode.

Ann. Biol. Clin., 1978, 36, 475-489.

38 - BURNETT W.

The composition of gallstones.

Tijdschr. Gastroenterol., 1971, 14, 34-45.

39 - WOSIEWITZ U.

Limy bile and radiopaque, calcified gallstones: a combined analytical, radiographic, and micromorphologic investigation.

Path. Res. Pract., 1980, 167, 273-286.

40 - DAUDON M., REVEILLAUD R.J.

Methods of urinary calculus analysis: a critical review.

Adv. Nephrol., 1986, 15, 219-244.

41 - HOLT P.F.; TARNOKY A.L.

The analysis of calculi using microchemical methods.

J. Clin. Pathol., 1953, 6, 114-122.

42 - SUZUKI N., NAKAMURA Y., KOBAYASHI N.

On metal element in pure pigment gallstones.

Tohoku J. Exp. Med., 1975, 116, 233-240.

- 43 - GORDON E.R., CHANT H., SAMODAI K., GORESKY C.A.
The isolation and further characterization of the bilirubin tetrapyroles in
bile containing human duodenal juice and dog gallbladder bile.
Biochem. J. , 1977, 167, 1-8.
- 44 - ROBINS S.J., FASULO J.M., PATTON G.M.
Lipids of pigment gallstones.
Biochem. Biophys. Acta, 1963, 75, 65-69.
- 45 - CHIHARA G., YAMAMOTO S., KAMEDA H.
Medical and biochemical application of infrared absorption spectra I.
Studies on gallstone by infrared spectra and X-Ray cristallography.
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1958, 6, 50-54.
- 46 - BOGREN H., KARE L.
An X-Ray diffraction study of cristalline cholesterol in some pathological
deposits in man.
Biochem. Biophys. Acta., 1963, 75, 65-69.
- 47 - SUTOR D. J. , WOOLEY S.
X-Ray diffraction studies of the composition of gallstones from English
and Australian patients.
Gut., 1969, 10, 681-683.
- 48 - LOOMIS C.R., SHIPLEY G.G., SMALL D.M.
The phase behavior of hydrated cholesterol.
J. Lipid. Res., 1979, 20, 525-535.

49 - RUIZ DE AGUIAR A., MEDINA NUNEZ J.A., LOPEZ DOMINGO M.I., VILLACORTA PATINO J., LEGUEY JIMENEZ S.

Calcium carbonate in cholesterol gallstones.

J.Hepatology, 1988, 6, 71-79.

50 - LEE Y.S.

High resolution electron microscope lattice image of powdered gallstones.

Micron Microsc. Acta , 1987, 18(4), 281-290.

51 - WOSIEWITZ U.

Scanning electron microscopy in gallstone research.

Scan. Electron. Microsc., 1983, 1, 419-430.

52- -CETTA F., BRALIA A., CAMPOPIANO M., DE NISI A.,

DE MAURIO D., PETRINI C., CALFA C.

Composizione, frequenza e probabile significato dei calcoli biliari contenti palmitato di calcio.

Policlino. Sez. Chir., 1984, 91, 1660-1669.

53 - ZILM K.W., GRANT D.M., ENGLERT E., STRAIGHT R.C.

The use of solid ¹³C nuclear magnetic resonance for the characterization of cholesterol and bilirubin pigment composition of human gallstones.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980, 93, 857-866.

54 - DAUDON M., PROTAT M.F., REVEILLAUD R.J.,
JAESCHKE-BOYER M.,

Infrared spectrometry and Raman microprobe in the analysis of urinary
calculi.

Kidney Int., 1983, 23, 842-850.

55 - TROTMAN B.W., MORRIS T.A., SANCHEZ H.M.,
SOLOWAY R.D., OSTROW J.D.

Pigment versus cholesterol cholelithiasis: identification and quantification
by infrared spectroscopy.

Gastroenterology, 1977, 72, 495-498.

56 - KLEIN B., WEISSMANN M., BERKOWITZ J.

Clinical applications of infrared spectroscopy. II. Identification of
pathologic concretions and other substances.

Clin. Chem. , 1960, 6, 453-465.

57 - SOLOWAY R.D., TROTMAN B.W., MADERY W.C.,
NAKAYAMA F.

Pigment gallstone composition in patients with hemolysis or
infection/stasis.

Dig. Dis. Sci., 1986, 31, 454-460.

58 - SCHAAD U.B., WEDGWOOD-KRUCKO J., TSCHAEPLER H.

Reversible ceftriaxone - associated biliary pseudolithiasis in children.

Lancet, 1988, ii, 1411-1413.

59 - FIGRAU C., PAHISSA A., GROPPER S., SUREDA D.,
MARTINEZ-VASQUEZ J.M.

Ceftriaxone-associated biliary pseudolithiasis in adults.

Lancet, 1989, *i*, 165.

60 - MOESCH C, GAINANT A., SAUTEREAU D.,

Lithiase biliaire de glafénine: Identification par spectrophotométrie
infrarouge.

Gastroenterol. Clin. Biol., 1988, 12, 387-389.

61 - MOESCH C., SAUTEREAU D., GAINANT A., PILLEGAND B.

Biliary drug lithiasis: dipyridamole gallstones.

Lancet, 1992, 340 (8831), 1352-1353.

62 - MOESCH C., DAUDON M., LEYMARIE J., RABY C.

Glaphenine-containing gallstones

Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1993, 31, 329-333.

63 - LEVISON D.A., CROCKER P.R., ALLEN S.D.

Applications of infrared microscopy to clinical diagnosis.

European Spectroscopy News, 1985, 62, 18-20.

64 - SUZUKI N.

On black pigment gallstones with special reference to difference from
melanins.

Tohoku J. Exp. Med., 1965, 85, 238-247.

65 - SUZUKI N.

On black pigment gallstones with special reference to comparison with bilirubin derivatives.

Tohoku J. Exp. Med., 1965, 85, 396-405.

66 - BURNETT W. DWYER K.R., KENNARD C.H.

Black pigment of polybilirubinate gallstones.

Ann. Surg. , 19.., 193, 331-333.

67 - MANOEUVRE J.

Calculs biliaires. Composition et analyse par spectrophotométrie infrarouge.

Thèse Pharmacie, Limoges France, 1989, 322.

68 - MOESCH C., SAUTERAU D., BERRY P., CESSOT F.,

GAINANT A., RABY C., PILLEGAND B.

Library of reference infrared spectra for the analysis of gallstones.

Gastroenterology, 1991, 100, A. 776.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	15
PREMIERE PARTIE: GENERALITES	
I.1. LES DIFFERENTES CLASSIFICATIONS.....	18
I.2. EPIDEMIOLOGIE.....	21
I.2.1. Répartition géographique.....	21
I.2.2. La race.....	22
I.2.3. L'âge.....	22
I.2.4. Le sexe.....	22
I.2.5. Régime et poids.....	22
I.2.6. Pathologie.....	23
I.2.7. Localisation des calculs.....	24
I.3. ASPECT ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES CALCULS PIGMENTAIRES.....	26
I.3.1. Les calculs pigmentaires bruns.....	26
I.3.2. Les calculs pigmentaires noirs.....	27
I.4. COMPOSITION DES CALCULS PIGMENTAIRES ET DE LA BILE.....	27
I.4.1. Les calculs pigmentaires bruns.....	28
I.4.2. Les calculs pigmentaires noirs.....	29
I.4.3. La bile.....	34
a- Les éléments minéraux.....	35
b- Les éléments organiques.....	35
I.5. PHYSIOPATHOLOGIE.....	39
I.5.1. Rappels sur la bilirubine.....	39
I.5.2. Génèse des calculs bruns.....	43
a- Rôle de l'infection biliaire.....	43
b- Autres facteurs favorisants.....	44
c - Cas particuliers des endoprothèses biliaires.....	45

I.5.3. Génèse des calculs noirs.....	47
a - Rôle de l'hyperhémolyse.....	47
b - Rôle des sels biliaires.....	48
c - Rôle de la mucine.....	48
d - Rôle du dioxyde de carbone.....	49
e - Formation de polymères.....	49
I.6. IDENTIFICATION ET TRAITEMENT DES CALCULS PIGMENTAIRES.....	50
I.6.1. Identification.....	50
I.6.2. Thérapeutique de dissolution des calculs pigmentaires.....	51
I.6.3. Perspectives d'avenir	52
I.7. METHODES D'ANALYSE DES CALCULS.....	53
I.7.1. Techniques chimiques.....	54
I.7.1.1. Méthodes qualitatives.....	54
I.7.1.2. Méthodes quantitatives.....	55
I.7.2. Techniques physiques.....	56
I.7.2.1. Méthodes fragmentaires.....	56
I.7.2.2. Méthodes globales.....	58
a - Techniques radiographiques.....	58
b - Méthodes optiques.....	60
c - Méthodes cristallographiques.....	61
d - Méthodes spectroscopiques.....	62
- Microsonde moléculaire à Laser (MOLE) ou microsonde Raman.....	62
- Spectrophotométrie infrarouge.....	63
DEUXIEME PARTIE: EXPERIMENTATION.....	68
II.1. SYNTHESSES.....	69
II.1.1. Matériel et réactifs.....	69
II.1.2. Principe.....	70

II.1.3. Synthèse du bilirubinate de calcium neutre.....	71
- Equation de la réaction.....	71
II.1.3.1. Synthèse selon EDWARDS.....	71
- Protocole.....	71
- Résultat.....	73
II.1.3.2. Synthèse selon MAKI.....	73
- Protocole.....	73
- Résultat.....	74
II.1.3.3. Synthèse selon SUTOR et WILKIE.....	74
- Protocole.....	75
- Résultat.....	76
II.1.4. Synthèse du bilirubinate de calcium acide.....	76
- Equation de la réaction.....	76
- Protocole.....	77
- Résultats.....	77
II.1.5. Synthèse du bilirubinate de calcium intermédiaire.....	77
- Equation de la réaction.....	77
- Protocole.....	79
- Résultats.....	79
II.1.6. Synthèse du polymère de bilirubine.....	79
- Protocole.....	79
- Résultat.....	80
II.2. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE.....	81
II.2.1. Matériel et réactifs.....	81
II.2.2. Méthode.....	82
a - Préparation des échantillons.....	82
b - Conditions d'enregistrement.....	82
II.2.3. Spectres.....	83
II.2.3.1. Produits purs.....	83

a - Bilirubine.....	85
b - Bilirubinate de calcium acide.....	87
c - Bilirubinate de calcium neutre.....	89
d - Bilirubinate de calcium intermédiaire.....	91
e - Polymère de bilirubine.....	93
II.2.3.2. Mélanges binaires.....	94
a - Mélange bilirubinate de calcium neutre/bilirubine.....	97
b - Mélange bilirubinate de calcium acide/bilirubinate de calcium neutre..	98
c - Mélange bilirubinate de calcium acide/bilirubine.....	99
II.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	100
II.3.1. Matériel et réactifs.....	100
II.3.2. Méthode.....	100
II.3.3. Résultats.....	101
a - Recherche du solvant d'éluion.....	101
b - Chromatographie de la bilirubine et de ses sels.....	104
TROISIEME PARTIE: DISCUSSION ET APPLICATION	
III.1 DISCUSSION.....	107
III.1.1. Limites de l'analyse infrarouge.....	107
III.1.2. Etude chromatographique sur couche mince.....	113
III.2. APPLICATION.....	114
III.2.1. Analyse de calculs biliaires.....	114
III.2.2. Analyse d'endoprothèses biliaires.....	115
CONCLUSION.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	121

BORDAS (Bruno). — Calculs biliaires. Etude physicochimique de la composante pigmentaire. — 137 f.; fig.; tabl.; 30 cm (Thèse : Pharm.; Limoges; 1993).

RESUME :

Dans les pays occidentaux, environ 80 % des calculs sont cholestéroliques et 20 % sont pigmentaires. Après avoir étudié les différentes classifications des calculs biliaires, nous avons porté notre attention sur les calculs pigmentaires. Ces derniers sont classiquement répartis en deux groupes, les calculs bruns et les calculs noirs qui diffèrent par leur épidémiologie, leur composition et leur physiopathologie.

Nous avons effectué la synthèse et l'étude par spectrophotométrie infrarouge et chromatographie sur couche mince des divers composants pigmentaires : bilirubinate de calcium et polymère de bilirubine. Les résultats de cette étude ont été appliqués à l'analyse de calculs biliaires et de dépôts obstruant la lumière d'endoprothèses biliaires.

MOTS CLES :

- Calcul biliaire.
- Endoprothèse biliaire.
- Lithiase biliaire pigmentaire.
- Spectrophotométrie infrarouge.
- Synthèse.

JURY : Président : Monsieur le Professeur J. BUXERAUD.
Juges : Monsieur C. MCESCH, Maître de Conférences.
Monsieur le Professeur D. SAUTEREAU.