



HAL
open science

Les pathologies microcristallines et les techniques de physicochimie : quelques avancées

Dominique Bazin, Michel Daudon

► **To cite this version:**

Dominique Bazin, Michel Daudon. Les pathologies microcristallines et les techniques de physicochimie : quelques avancées. *Annales de Biologie Clinique*, 2015, 73 (5), pp.517-534. 10.1684/abc.2015.1070 . hal-01240999

HAL Id: hal-01240999

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-01240999v1>

Submitted on 9 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Les pathologies microcristallines et les techniques de physicochimie : quelques avancées

D. Bazin, M. Daudon

1. CNRS, laboratoire de chimie de la matière condensée de Paris, UPMC, collège de France, 75231 Paris cedex 05, France.
2. Université Paris XI, laboratoire de physique des solides, 91405 Orsay cedex, France
3. AP-HP, hôpital Tenon, service d'explorations fonctionnelles, 75970 Paris cedex 20, France

Correspondance: Michel Daudon, AP-HP,
Hôpital Tenon, service d'explorations fonctionnelles,
4, rue de la Chine, 75970 Paris cedex 20, France.
michel.daudon@tnn.aphp.fr

Résumé. Cette mise au point a pour objet de dépeindre les avancées récentes effectuées pour les pathologies microcristallines grâce à la mise en œuvre de techniques de physicochimie. Pour le clinicien, cette nouvelle opportunité permet pour certaines pathologies sévères la pose d'un diagnostic précoce. En ce qui concerne les pathologies microcristallines rénales, plus de quatre cents biopsies ont déjà bénéficié d'une telle approche. L'ensemble des données permet une description précise de la physicochimie associée, étape incontournable si l'on désire comprendre en détail les processus biochimiques responsables de leur formation. Parmi ces quatre cents patients, soulignons que pour 7 d'entre eux, la pose d'un diagnostic précoce à partir notamment des mesures réalisées sur le synchrotron Soleil leur a permis d'éviter la dialyse et la greffe.

Désormais, nous nous intéressons à des pathologies microcristallines touchant d'autres organes et cette recherche s'effectue sur le plan international en étroite collaboration avec différents services d'anatomopathologie et plusieurs équipes médicales françaises et étrangères. Après avoir esquissé le formalisme de deux techniques, la microscopie électronique à balayage et la microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier qui jouent un rôle-clé dans cette recherche, quelques exemples sont donnés. Pour la spectroscopie infrarouge, l'utilisation du rayonnement synchrotron comme sonde sera abordée.

L'émergence des nouvelles technologies dans le domaine médical autorise un nouveau paradigme concernant les pathologies microcristallines [1-4]. Sur le plan clinique, l'un des défis consiste à clarifier la relation à la pathologie. S'agit-il d'un lien de causalité ou d'une simple proximité spatiale. Ce lien de causalité peut s'avérer réciproque, la calcification pouvant être la conséquence directe de la pathologie (calculs et cristaux rénaux composés de dihydroxy-2,8 adénine) [5,6] comme elle est susceptible d'induire un changement du phénotype de la cellule [7].

Le spectre des pathologies qui s'accompagnent de calcifications est étendu. De facto, étudier ces entités biologiques conduit à des avancées sur certaines formes de cancers [8], sur les processus infectieux [9], sur des maladies environnementales [10] et génétiques [11]. Quel intérêt pour le clinicien ? Préciser les caractéristiques physicochimiques de ces formes de dépôts minéraux anormaux, calciques ou non, dans un tissu ou un organe permet la pose d'un diagnostic médical précoce car cette caractérisation s'effectue à l'échelle subcellulaire. Parmi les quatre cents patients qui ont bénéficié de cette nouvelle approche, sept d'entre eux ont évité la dialyse et donc la greffe. L'ensemble de cette étude a mis en évidence une diversité structurale et chimique des calcifications ectopiques rénales que la littérature médicale a à peine esquissée [12,13], ouvrant ainsi un nouveau champ de recherche. Quel intérêt pour le physicochimiste ? En décrivant à différentes échelles (du macroscopique à l'échelle atomique) de manière originale les conditions physico-chimiques et biologiques qui sous-tendent leur genèse, une recherche fondamentale sur les processus de réactivité de surface entre éléments traces et nanocristaux (catalyse, adsorption) ou encore sur la conception de matériaux bio-inspirés minéral-organique est engagée.

La démarche scientifique

Inspirée de celle définie par Claude Bernard (1813-1878), dont on a célébré il y a peu le bicentenaire de la naissance, elle coordonne trois étapes : l'observation, la mise en place d'un formalisme théorique et enfin la conception d'un protocole de synthèse respectant la physiologie. Cette recherche est complexe. En effet, la synthèse de ces nanomatériaux hybrides minéral-organique s'accomplit dans un milieu à fluide circulant (inhomogène et de pH variable entre 4.5 et 7.6) dont la géométrie est de type « μ fluidique » avec des parois qui sont le siège de transfert d'anions et de cations. La première partie constitue donc un espace de recherche où beaucoup d'observations restent à effectuer. Pour la deuxième étape, notons

que des avancées significatives ont été réalisées récemment sur le formalisme théorique simulant le processus de minéralisation lorsqu'elles sont issues d'une sursaturation [14-16]. Ces nouveaux développements intégrés dans le logiciel Nanokin permettent par exemple d'appréhender la compétition entre deux phases minérales de même composition mais de solubilités différentes à partir d'une solution initialement sursaturée. Ainsi, dans le cas des calculs rénaux d'oxalate de calcium (qui représentent près de 70% des calculs dans les pays industrialisés), deux phases la whewellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) la plus stable thermodynamiquement et la weddellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sont générées l'une étant associée à un contexte d'hyperoxalurie (la whewellite) l'autre à un contexte d'hyperoxalurie (la weddellite). Ce nouveau logiciel Nanokin [17] devrait donc permettre des avancées majeures dans la quantification de cette compétition d'autant plus qu'il permet d'appréhender les processus de nucléation hétérogène associés à la plaque de Randall. Ce dépôt de phosphate de calcium sert en effet de centre nucléateur pour les calculs d'oxalate de calcium. L'autre point d'importance majeure offert par ce logiciel pour les calcifications pathologiques est lié à l'opportunité d'envisager le rôle de certains cations dans la formation de calcifications vasculaires chez les patients dialysés. En effet, la littérature médicale et physicochimiste souligne l'importance de Mg^{2+} comme inhibiteur des processus de nucléations et/ou de croissance des phosphates de calcium [18,19]. Ce logiciel permettrait d'évaluer de manière plus significative le rôle de ce cation en jouant sur la nature de ces ligands.

Enfin, il convient de relever que la synthèse de ce type de matériaux comme les oxalates de calcium constitue un sujet de recherche d'actualité majeur à la croisée de thématiques liées à la médecine, à la biologie végétale ou encore à la conservation de monuments historiques [20-23]. En ce qui nous concerne, un projet est en cours pour simuler, en respectant au mieux la physiologie du rein, la germination-croissance de ces calcifications [24]. Notons qu'une telle synthèse doit tenir compte de la présence d'éléments traces [25,26]. Finalement, pour cette thématique, si les modèles animaux sont peu nombreux car présentant une limitation liée à la physiologie, des résultats majeurs ont été obtenus [27,28].

Sur la figure 1, nous avons voulu schématiser cette recherche mise en place sur le plan international qui s'est établie autour de collaborations multicentriques et multidisciplinaires impliquant des équipes médicales et des physico-chimistes. Elle conjugue la caractérisation de calcifications pathologiques [1-3,29] de différentes entités biologiques (thyroïde, cartilage [30-33] système auditif (otolithes), reins [34-36], glandes mammaires, prostate [37,38], système cardiovasculaire [39,40]) par des techniques de laboratoire ou spécifiques aux grands

instruments. Les techniques d'imagerie (Figure 1A) comme la microscopie électronique à balayage (MEB) ou en transmission (MET) permettent de caractériser la structure de ces entités à des échelles submicroniques (et sans aucune préparation de l'échantillon pour le MEB) [11,41-44]. Les spectroscopies vibrationnelles (Figure 1B) de laboratoire (spectroscopie de génération du second harmonique ou SHG, spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier, spectroscopie RAMAN) ou implantées sur le synchrotron soleil (lignes de lumière DISCO pour la spectroscopie UV Visible, AILES et SMIS pour la spectroscopie dans le proche infra-rouge et l'infra-rouge moyen) décrivent avec une grande précision la chimie des phases présentes au sein de ces calcifications [45-49]. Les techniques de fluorescence X (le montage prototype de micro-Fluorescence X du laboratoire de Physique des Solides, le montage PIXE - Proton Induced X-ray Emission du laboratoire Pierre Süe (CNRS-CEA) ou encore la ligne de lumière ID21 de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) permettent d'identifier les éléments traces (Figure 1C) susceptibles d'être adsorbés ou piégés [50-53]. Eventuellement, on procède à des expériences de spéciation par spectroscopie d'absorption X [54-60] afin de préciser leur état d'oxydation et leur environnement (ligne de lumière DIFFABS) [61-68]. Enfin, les techniques de diffraction des rayons X (Figure 1D) soit de laboratoire, soit implantés sur le synchrotron SOLEIL (lignes de lumière DIFFABS et CRISTAL) ou encore des expériences de diffraction de neutrons (ligne d'expérience G4.1 implantée sur le LLB) complètent ces informations en mesurant la taille des briques primaires qui constituent les calculs et les calcifications, c'est-à-dire les cristaux [66-68] ou permettent la résolution de structures jusqu'ici non observées [69-74]. Plus récemment, des résultats particulièrement remarquables ont été obtenus en RMN [75-77]. Bien sûr d'autres techniques comme la microtomographie donnent des résultats intéressants [78-80].

Les concepts de physicochimie associés à cet axe de recherche sont empruntés à la chimie douce [81], la science des surfaces et à la nanochimie. Cette projection des concepts est illustrée par différents parallèles que nous avons établis en prenant comme l'une des sources les cours des Prof. J. Livage et C. Sanchez au Collège de France [82,83]. La première similarité (Figure 1E) avec les calcifications pathologiques est liée à une dénomination, les particules dites « Janus », introduite en 1991 par Pierre-Gilles de Gennes [84], Prix Nobel de Physique, lors de la conférence donnée devant la Royal Swedish Academy of Sciences suite aux résultats obtenus par Casagrande et Veyssié [85]. Comme le souligne A. Perro et al. [86], si les premiers travaux concernaient des particules sphériques dont les deux hémisphères

portaient des fonctions chimiques différentes, ce nanomatériau original offre l'opportunité de développer des entités complexes puisque l'on peut engendrer cette dissymétrie en jouant aussi sur la structure en concevant par exemple des nanotubes de platine sur lesquels on « enroule » des fils de cobalt, cette disposition introduisant ainsi une notion de chiralité suivant le sens de l'enroulement [59]. Si l'on s'intéresse aux calcifications pathologiques, on observe des particules Janus avec d'un côté une phase minérale et de l'autre une phase organique. De telles structures sont attestées lorsque les plaques de Randall (calcifications tissulaires présentes au sommet de la papille) sont constituées d'aiguilles d'urate de sodium à l'extrémité desquelles se situent des sphères d'apatite. On observe ainsi des particules Janus hybrides organo-minérales.

En chimie douce, la notion de gabarit est une notion majeure [87]. L'utilisation des propriétés d'auto-assemblage des molécules et polymères amphiphiles permet de générer des gabarits supramoléculaires et donc de contrôler la texture et la morphologie des phases en croissance [88,89]. Cette contrainte exercée sur la morphologie de la phase minérale par une phase organique est retrouvée lorsque l'on observe les plaques de Randall par microscopie électronique à balayage. En effet, si nous venons d'évoquer le cas où cette structure est constituée d'aiguilles d'urate de sodium, la plaque de Randall est le plus souvent formée d'un phosphate de calcium de structure apatitique (Figure 1F). Elle se présente alors à l'échelle mésoscopique comme une agglomération de tubes collecteurs calcifiés soit pleins soit vides [90]. Cette structure si particulière nous permet d'entrevoir une nouvelle classe de vecteurs thérapeutiques où le principe actif serait inséré non pas dans des matériaux pourvus de canaux ou d'espaces structurés à courte et longue distance comme c'est le cas des solides poreux développés par G. Férey [91] mais dont l'organisation structurale n'existerait en fait qu'à courte distance. En effet, la brique élémentaire de la plaque de Randall résulte de nanocristaux d'apatite agglomérés en sphères et c'est l'accumulation de ces sphérules maintenues entre elles par une trame organique (Figure 1F1) à la surface interne des tubes collecteurs du rein qui donne lieu à la formation des tubes. On peut imaginer des cylindres dont les parois seraient constituées d'une agglomération de sphères d'apatite et de protéines et qui seraient chargées en principe actif. On serait ainsi en présence d'un matériau à la fois bioinspiré et biocompatible. Enfin, pour terminer avec la notion de gabarit, présentons un autre cas donné par les calculs rénaux induits par une infection bactérienne. Dans ce cas, on retrouve à la surface des parties du calcul formées d'apatite les empreintes de bactéries (Figure 1G) [69,70]. Ainsi, le clinicien peut profiter de la plasticité des apatites biologiques pour mettre en

évidence des processus infectieux pour des patients formant des calculs dans des contextes asymptomatiques.

La dernière passerelle que l'on peut concevoir entre matériaux biologiques et chimie douce est liée aux défauts présents à la surface des calcifications (Figure 1H). De manière succincte, la physique des surfaces les distingue par leur dimension spatiale. Un défaut ponctuel (de dimension zéro) correspond à une lacune (absence d'un atome) ou à la présence d'une impureté. Un défaut à une dimension s'associe à une dislocation (absence d'une colonne d'atomes) définie par le vecteur de Burger qui en donne l'orientation et l'amplitude. Ces dislocations peuvent éventuellement s'organiser en réseau. Les marches présentes à la surface sont des défauts à deux dimensions dont l'orientation est définie par la structure cristalline du composé ainsi que par des processus de relaxation. Enfin à trois dimensions, des puits (ou pits en anglais) ont été observés dans différents composés comme SiC (Figure 1H1), GaN, l'hydroxyapatite ou encore l'oxalate de calcium [92]. L'observation de ces défauts est primordiale lorsque l'on s'intéresse aux modes d'action d'un médicament susceptible d'altérer la formation des cristaux ou sensé dissoudre la calcification. Dans le cas de calculs de cystine [93], nous avons observé différents types de défauts de surface, la nature de ces défauts étant directement reliée au traitement médical suivi par le patient [71].

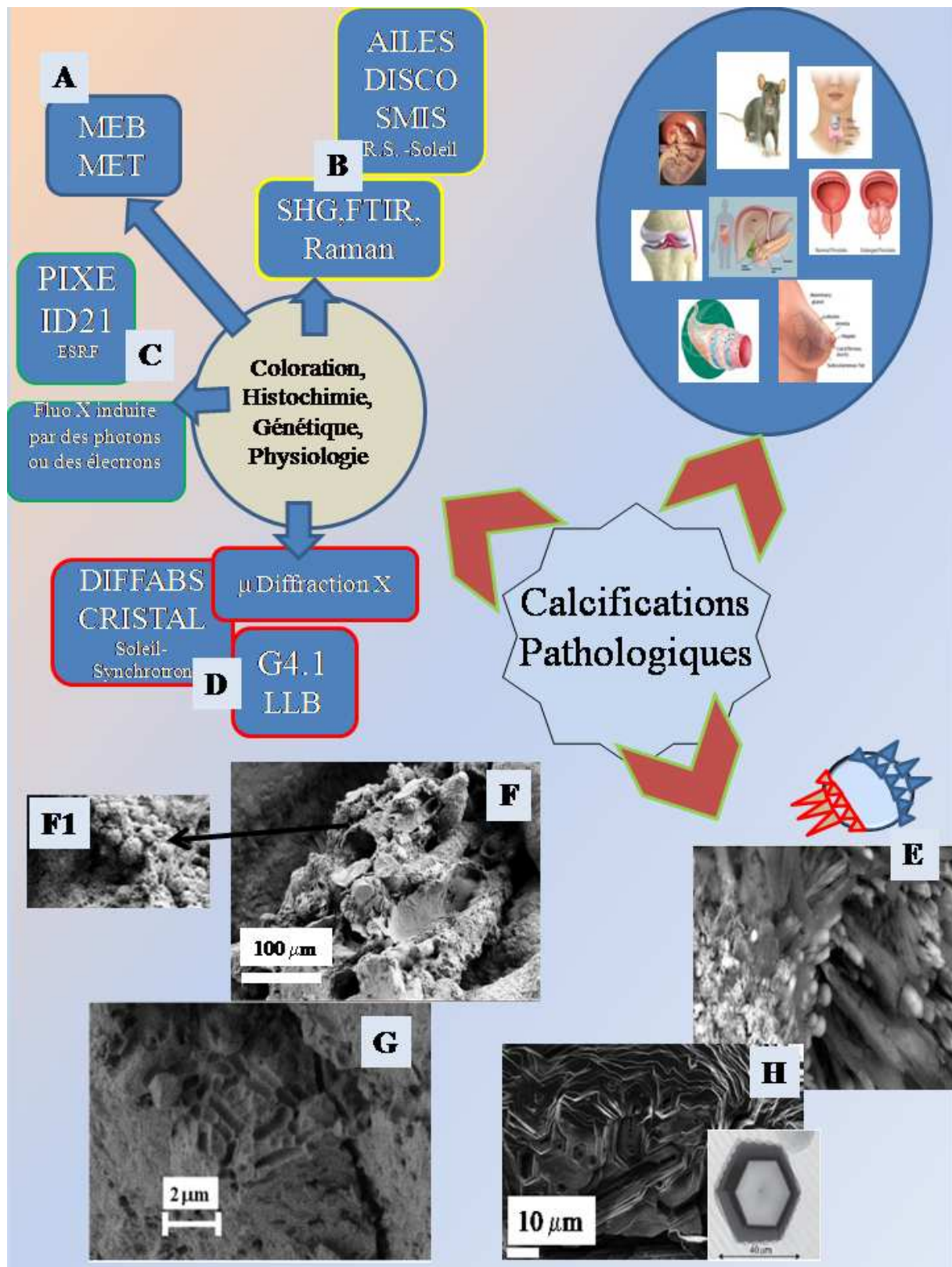


Figure 1. Schéma de la recherche mise en place pour l'étude des calcifications pathologiques. A. techniques d'imagerie (MET, MEB) ; B. Spectroscopie vibrationnelle ; C. Techniques de fluorescence X ; D. Techniques de diffraction des rayons X ou des neutrons ; E. Particules Janus ; F. Plaque des Randall et notion de gabarit ; G. Empreintes de bactéries et notion de gabarit ; H. Défauts présents à la surface de calcifications.

Cet article qui s'inscrit à la suite d'une première mise au point sur l'application de ces techniques à l'analyse des calculs rénaux [94] s'attache à dépeindre toute la potentialité de deux techniques qui jouent un rôle primordial dans la caractérisation d'entités biologiques, la spectrophotométrie infra rouge à transformée de Fourier et la microscopie électronique à balayage à effet de champ. Après en avoir brièvement esquissé la physique sous-jacente, nous évoquerons certaines avancées significatives que nous avons obtenues dans l'étude de calcifications pathologiques et plus particulièrement dans le cas des calcifications ectopiques.

La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

Découvert par W. Herschel [95], le rayonnement infrarouge [96-98] signifie « en deçà du rouge » (du latin infra : « plus bas »). L'infrarouge, dont la longueur d'onde est comprise entre 780 nm et 1000 μm , est une onde électromagnétique d'énergie inférieure à celle de la lumière rouge. L'infrarouge est subdivisé usuellement en trois régions, l'IR proche (PIR : de 0,78 μm à 1,4 μm), IR moyen (MIR : de 1,4 à 25 μm) et IR lointain (de 25 μm à 1000 μm). En ce qui nous concerne, le domaine infrarouge (moyen) correspond à des longueurs d'onde λ comprises entre 2,5 et 25 μm (soit pour le nombre d'onde $\nu = 1/\lambda$ des valeurs comprises entre 4000 et 400 cm^{-1}). La partie comprise entre 1500 cm^{-1} et 400 cm^{-1} est usuellement appelée "empreinte digitale" et comprend un grand nombre de bandes. Dans la partie comprise entre 4000 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} sont positionnées la plupart des bandes caractéristiques de groupes fonctionnels.

Chaque bande d'absorption correspond à un saut entre deux niveaux vibrationnels et à une vibration de certains groupements d'atomes (Figure 2A). Les vibrations de valence s'associent préférentiellement à des élongations suivant les axes de liaisons (notées ν). D'autres sont plutôt reliées à des déformations d'angle de valence et sont dénommées "vibrations de déformation". Ces déformations peuvent avoir lieu dans le plan des deux liaisons concernées (notées δ) ou hors du plan (notées γ ou ρ). Les vibrations ne donnent pas lieu systématiquement à une absorption, la vibration doit induire une variation du moment dipolaire. Ainsi, pour une molécule linéaire ABA, seuls les modes antisymétriques sont actifs en IR.

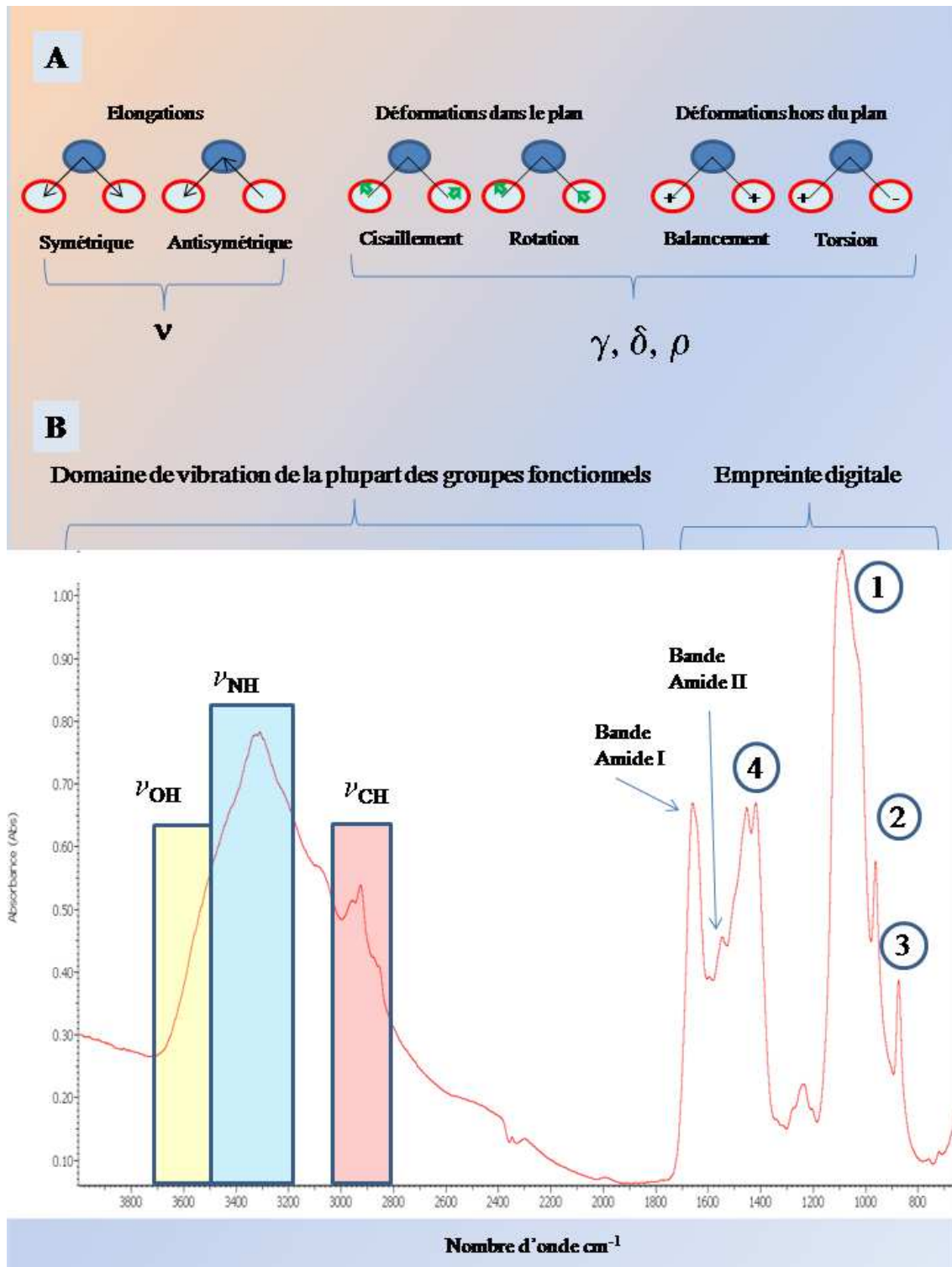


Figure 2. (A) Différents types de vibrations (élongations, déformations dans le plan, déformations hors du plan) ; (B) identification des différentes bandes d'absorption pour un spectre d'absorption infrarouge tissulaire contenant une calcification ; (1) et (2) vibrations de valence asymétrique et symétrique des groupements PO_4^{3-} ; (3) et (4) vibrations de valence et de déformation des groupements carbonates.

La majorité des vibrations fondamentales des molécules organiques se trouve dans le moyen IR. La position des bandes peut s'expliquer qualitativement en considérant dans un modèle très simplifié la liaison chimique comme un ressort possédant une constante de raideur définie par la nature de la liaison (approche classique de la théorie vibrationnelle). Plus la liaison est forte (simple, double ou triple), plus la fréquence de résonance est grande. On définit alors la fréquence de vibration (ou de résonance) par :

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Avec:

- k : constante de raideur,
- μ : masse réduite des deux atomes.

On peut ainsi comprendre simplement la position relative dans le spectre d'absorption des liaisons C-C puisque ν est proportionnelle à k et donc $\nu_{C\equiv C} > \nu_{C=C} > \nu_{C-C}$. De même, on peut classer les différentes liaisons C-H, C-C, C-O, C-F, C-Cl, C-Br, C-I, puisque ν est inversement proportionnelle à la masse réduite μ . Finalement, même si l'attribution des fréquences de vibration dépend fortement de μ et k, de nombreux facteurs internes ou externes à la molécule ont une influence sur la fréquence de vibration. L'environnement et la conformation jouent un rôle sur la fréquence de la vibration. Ainsi, pour les calculs urinaires composés d'oxalate de calcium, il nous est possible de distinguer l'oxalate de calcium monohydraté du dihydraté, même si ces deux composés ont des formules stœchiométriques très proches.

Finalement, il convient de souligner les avancées spectaculaires effectuées en spectroscopie infra rouge en substituant à la source interne le rayonnement synchrotron [99]. Le point de départ du rayonnement synchrotron est donné par un français, Alfred-Marie Lienard qui publie en 1898 le premier calcul correct donnant la puissance rayonnée par une charge en mouvement accélérée [100]. Dans la mesure où l'on conçoit un dispositif avec une trajectoire fermée, le Pr Oliphant à Birmingham réalise en 1943 qu'il convient de synchroniser la fréquence de la tension accélératrice avec le moment de passages des particules. Sur le plan expérimental, ce sont des électrons qui circulant à une vitesse proche de celle de la lumière dans un aimant de courbure ont leur cheminement de ce fait modifié et génèrent une émission de lumière dite rayonnement synchrotron. Nombreux sont les anneaux de stockage dédiés à l'étude de la matière. En fait, il en existe aujourd'hui plus d'une cinquantaine à travers le monde, chacun étant doté d'une quarantaine de stations expérimentales fonctionnant 24h/24 et 7 jours sur 7 [101].

Ce changement de source permet des expériences de spectroscopie infrarouge avec une résolution spatiale limitée non par le rapport signal sur bruit mais par la diffraction [102]. Une partie significative de ces expériences de spectroscopies vibrationnelles portent sur le diagnostic médical. Comme le rapportent F. Draux [103] et C. Kendall [104], une telle approche a été réalisée dans le cas du cancer bronchique, du sein, de l'œsophage, du colon, de la prostate. Bien sûr, les cancers ne sont pas les seules pathologies concernées [105] et dans certaines pathologies, le diagnostic s'effectue par le biais des calcifications [106].

La caractérisation des calcifications ectopiques dans le tissu rénal par spectroscopie infrarouge bénéficie de toute l'expertise déployée pour la caractérisation des calculs rénaux [107-110].

Sur la figure 2B, nous avons voulu décrypter la lecture d'un spectre infrarouge d'un tissu contenant une calcification. Aux bandes d'absorption tissulaire (ν_{OH} , ν_{NH} et ν_{CH} entre 3600 et 2800 cm^{-1} et bandes amide I et amide II des protéines respectivement à 1650 et 1540 cm^{-1}), s'ajoutent des contributions supplémentaires dont la position permet l'identification des calcifications. Lorsque celles-ci sont composées de phosphate de calcium de structure apatitique, plusieurs bandes d'absorption doivent être considérées [109] : 1030 cm^{-1} (ν_3), 960 cm^{-1} (ν_1), 601 et 570 cm^{-1} (ν_4), 474 cm^{-1} (ν_2). Dans notre cas, on reconnaît les bandes de vibrations à 960 cm^{-1} et entre 1000-1300 cm^{-1} qui correspondent respectivement aux modes ν_1 et ν_3 du groupe PO_4^{3-} . D'autres bandes intenses sont observables, celles liées aux carbonates CO_3^{2-} substitués aux hydroxyles dans la structure apatitique (Figure 2B : (1) vibrations ν_3 à 1410, 1450 cm^{-1} , (2) vibration ν_4 à 875 cm^{-1}).

Les travaux effectués sur la ligne de lumière SMIS implantée sur le synchrotron SOLEIL ont permis la mise en évidence d'une grande diversité chimique des calcifications tissulaires rénales [46]. De plus, ce type de montage permet un diagnostic précoce de certaines pathologies particulièrement sévères comme le déficit en APRT adénine phosphoribosyltransférase [46] puisqu'il devient possible de caractériser des microcristaux. Les cartographies chimiques des différents composés basées sur les raies d'absorption IR sont désormais réalisables à l'échelle de quelques micromètres ($\approx 5\mu\text{m}$). Dès lors, il devient possible de combiner la physiologie et la physicochimie à une échelle subcellulaire. Sur la Figure 3, à partir des spectres infra rouge (Figure 3A) collectés tous les 30 μm sur l'ensemble de la biopsie, on choisit la bande d'absorption infrarouge correspondant à l'oxalate de calcium monohydraté (flèche rouge sur la figure 3A : 781 cm^{-1}) pour en déduire la répartition spatiale (Figure 3B) au travers d'un tracé en 2D de l'intensité (ou de l'aire) de cette bande. L'intégration de la génétique dans cette démarche ouvre alors des perspectives exceptionnelles dans la compréhension des processus biochimiques qui sous-tendent la pathogénèse des calcifications ectopiques [27,28].

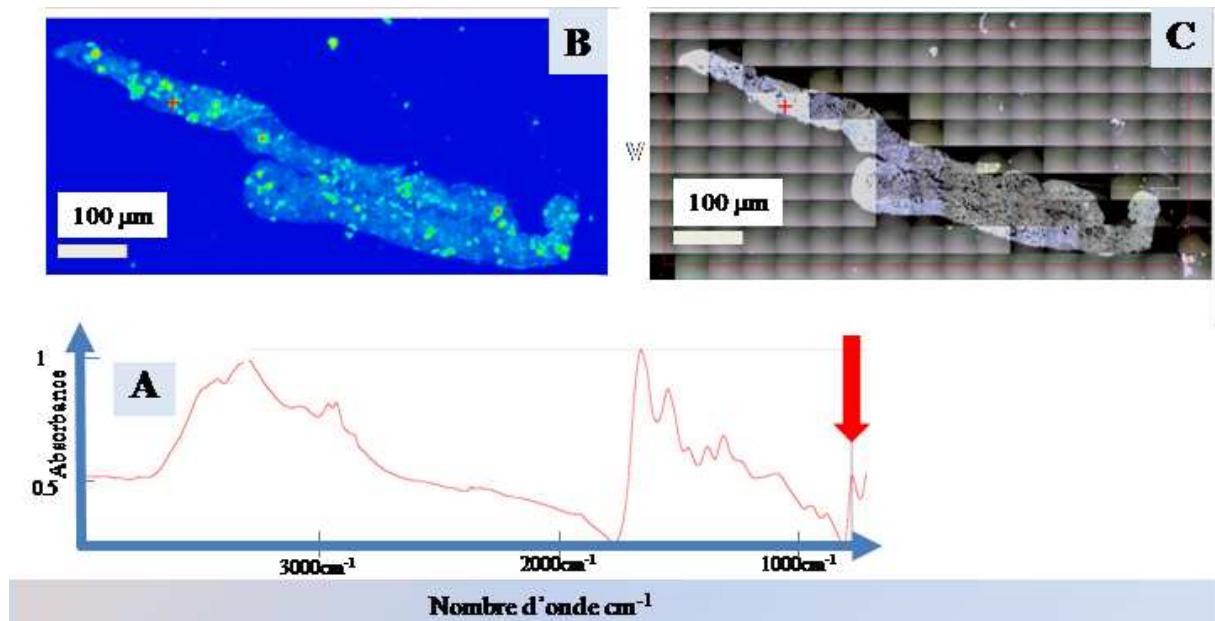


Figure 3. Cartographie à l'échelle cellulaire d'une biopsie rénale montrant la répartition des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté. A : spectre infrarouge montrant la présence de whewellite (flèche rouge). B : répartition spatiale de la whewellite obtenue par reconstruction à partir du maximum de la bande d'absorption associée à la whewellite. Les zones de couleur verte correspondent aux zones d'intensité maximale du signal. C. image optique de la biopsie rénale.

La microscopie électronique à balayage

Depuis son apparition, le microscope électronique à balayage (MEB) s'est révélé être un puissant outil de caractérisation texturale et chimique locale de matériaux massifs [112]. Basée sur l'interaction électron – matière, le terme “électronique ” témoigne de l'utilisation d'électrons comme particule sonde et celui de “balayage” rappelle que c'est au cours du déplacement du faisceau d'électrons sur la surface de l'échantillon que se construit l'image de la surface de l'échantillon sur l'écran de visualisation.

L'ensemble des observations a été réalisé au Laboratoire de Physique des Solides grâce au microscope Zeiss SUPRA55VP/Gemini à Orsay et au CEMHTI d'Orléans. En raison du caractère isolant de nos échantillons, des électrons primaires de faible énergie (tension accélératrice de 2KV) ont été utilisés. Pour ce qui est de la détection, le microscope implanté à Orsay comprend deux détecteurs d'électrons secondaires. Ce type de dispositif a été largement utilisé en médecine afin d'apprécier la calcification de dispositifs médicaux comme les stérilets [113], les implants mammaires [114], les valves cardiaques [115], les implants oculaires [116], des stents vasculaires [117], les sondes urinaires [118].

Dans le cadre de ces observations à l'échelle mésoscopique, il convient de s'intéresser à l'une des propriétés physiques des cristaux : leur morphologie [119]. De nombreux cristaux se présentent sous la forme de polyèdres convexes limités par des faces planes. Notons que pour développer une morphologie typique, les faces du cristal doivent pouvoir croître sans entrave.

Il convient de rappeler certaines notions concernant la cristallographie morphologique i.e. l'étude des caractères géométriques des polyèdres cristallins [119]. La forme des cristaux est régie par des lois inhérentes aux angles entre les faces ou entre les arêtes. Ainsi la loi de constance des angles, la loi des indices rationnels simples et la loi de symétrie. La première, énoncée en 1669 indique que dans les cristaux d'une même espèce cristalline, l'extension des faces n'est pas un caractère constant. Ce sont les angles entre les faces ou les arêtes qui sont constants chez tous les individus de l'espèce. La loi de Haüy (1784) précise que les faces et les arêtes ne sont pas définis au hasard. Les faces des polyèdres sont représentatives des plans réticulaires denses (ceux qui contiennent un maximum d'atomes). Si cette loi de Haüy limite les orientations possibles pour les faces, elle ne permet pas pour autant de prévoir celles qui se développent réellement. La troisième loi dite loi de symétrie semble évidente. Dans la mesure où les faces des polyèdres correspondent à des plans réticulaires, la symétrie morphologique est liée à la symétrie du réseau. Toutefois, cette symétrie morphologique peut être inférieure à la symétrie réticulaire. En fait, le groupe ponctuel morphologique n'est autre que le groupe ponctuel (moins les éléments de translation) des éléments de symétrie de la maille.

Des lors, il est possible à partir de la morphologie des cristaux d'en déduire les caractéristiques cristallographiques des phases chimiques. Ainsi les cristaux de cystine exhibent une morphologie hexagonale, morphologie cohérente avec la structure cristallographique de ce composé qui présente un axe de symétrie d'ordre 6 [120]. De même, pour les cristaux de weddellite qui s'observent sous la forme de bipyramide [121]. Pour les cristallites d'oxalate de calcium monohydraté, l'existence de plusieurs morphologies a été précédemment dévoilée [122]. L'un des points majeurs de ces observations est l'opportunité offerte par la microscopie électronique à balayage de relier la morphologie à la pathologie. Ainsi, la morphologie et l'organisation des cristaux de whewellite permettent d'orienter le diagnostic vers une pathologie sévère, l'hyperoxalurie primaire [11]. En effet, l'organisation et surtout la forme des cristallites à l'échelle mésoscopique apparaît différente, pour une même composition cristalline, selon la sévérité du processus cristallogène, génétique pour une hyperoxalurie primaire (Figure 4A) ou environnemental pour une hyperoxalurie diététique (Figure 4B).

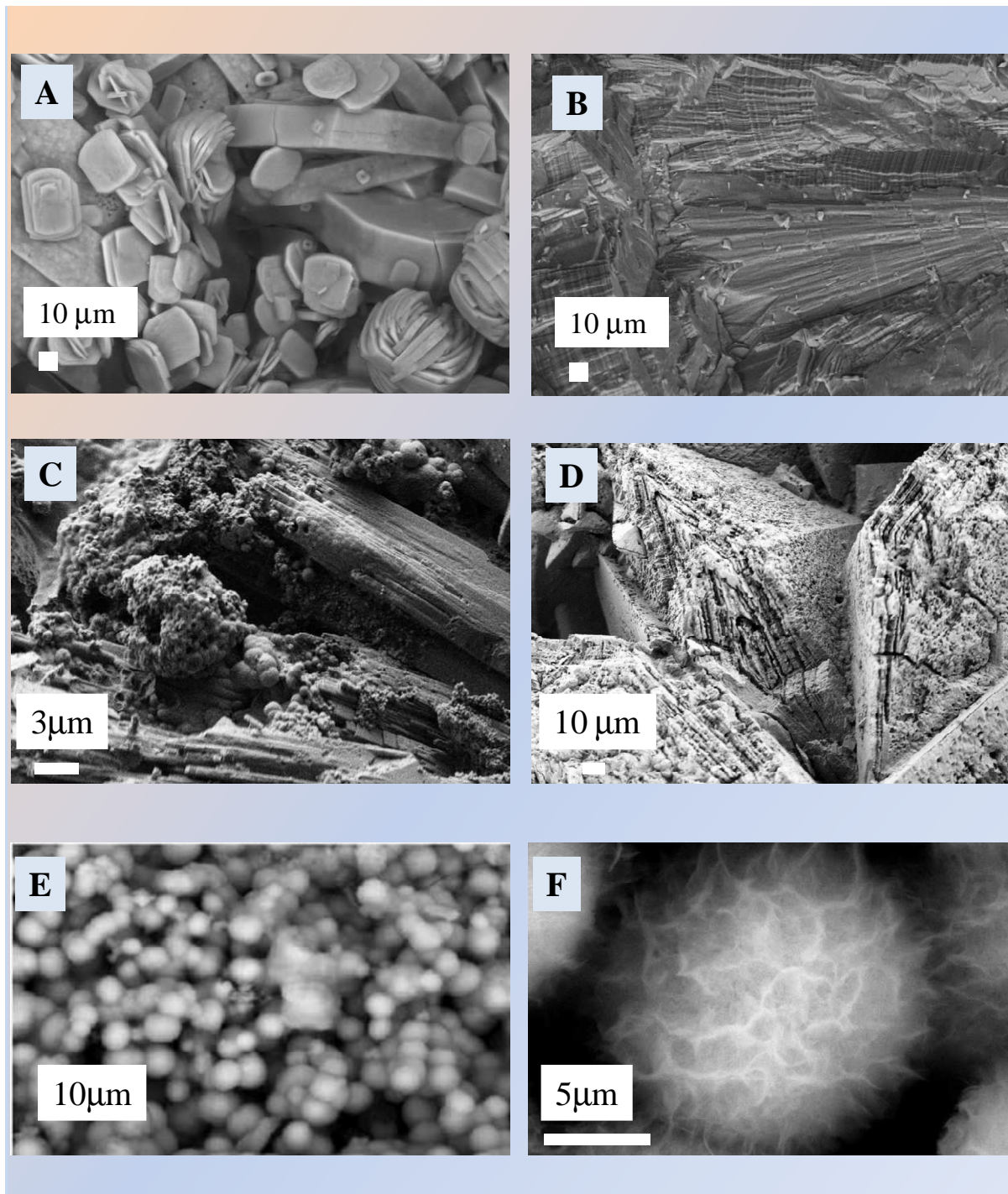


Figure 4. A. Cristaux d'oxalate de calcium monohydraté correspondant à une hyperoxalurie primaire. B. Cristaux d'oxalate de calcium monohydraté correspondant à une hyperoxalurie environnementale. C. Clichés MEB dévoilant la transition de phase s'effectuant entre les aiguilles natives de brushite et les sphères d'apatite. D. Cliché MEB dévoilant la transition de phase dans laquelle les bipyramides de l'oxalate de calcium dihydraté s'estompent au profit des cristallites d'oxalate de calcium monohydraté. E. structure sphérique des apatites biologiques observée à faible agrandissement. F. Agglomération de cristaux de phosphates de calcium de structure apatitique de taille nanométrique mise en évidence à plus fort grandissement.

Cette approche par une technique de physicochimie est bien plus rapide que l'approche effectuée par la génétique et sans doute plus fiable dans la mesure où tous les gènes déficients n'ont pas été identifiés.

Notons que dans cette approche où l'on tente de relier la morphologie des cristallites et la phase chimique à l'étiologie, il existe plusieurs difficultés. La première est inhérente aux transitions de phase. Ainsi, des aiguilles de brushite natives se transforment en sphères d'apatite (Figure 4C) et les arêtes des bipyramides d'oxalate de calcium dihydraté s'effacent lors de la transition vers l'espèce monohydratée (Figure 4D). Le paragraphe suivant souligne d'autres difficultés. A l'opposé, la morphologie typique des cristallites de phosphates de calcium de structure apatitique biologique ($\text{Ca}_{10-x+u}\text{□}_{x-u}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x\text{OH}_{2-x+2u}\text{□}_{x-2u}$) est sphérique [123,124]. Cette morphologie sphérique (Figure 4E) observée à l'échelle mésoscopique s'explique par l'agglomération de cristaux de phosphates de calcium de structure apatitique de taille nanométrique (Figure 4F). Le fait que ces cristallites soient générés dans un liquide complexe contenant une multitude de composés organiques et inorganiques peut engendrer des morphologies qui ne sont pas soumises aux lois de Hauy. Ainsi, Jauregui-Zuniga et al. [125] ont montré que l'incorporation croissante d'une partie organique dans la solution mère permettant la synthèse de cristaux d'oxalate de calcium conduit à la formation de cristallites exhibant des arrondis en lieu et place des arêtes. D'autres possibilités existent pour expliquer l'observation des arrondis comme une amorphisation ou encore des écarts à la stœchiométrie.

En ce qui concerne l'agencement des cristallites dans un volume fini, peu de travaux traitent de ce sujet. On peut néanmoins donner quelques éléments de réponse. Le nombre maximal de petites sphères de même rayon qu'on peut empiler dans une grande portion A de l'espace est proportionnel au volume de A, mais quel est le rapport de proportion ? Ce problème, posé par Kepler, n'a été résolu qu'en 1999. La réponse ne dépend pas de A, lorsque A est très grand. Le périmètre de A joue un rôle au second ordre. Si on veut choisir A pour rendre ce second terme le plus petit possible, on est conduit au problème isopérimétrique [126]. Par définition, en géométrie euclidienne, l'isopérimétrie est l'étude de propriétés des figures géométriques qui ont le même périmètre. Le problème le plus classique étant celui de la forme géométrique qui a la plus grande aire pour un périmètre donné. D'après la légende, le reine Didon aurait été la première à résoudre (intuitivement) ce problème [127]. Une corde disposée sur le sol doit prendre la forme d'un cercle plutôt qu'un triangle, un rectangle, un carré ou toute autre forme géométrique fermée et sans point double si l'on désire définir la plus grande surface possible. Les Grecs se sont intéressés à ce problème et l'ont résolu dans le cas d'un polygone à n côtés : celui qui a la plus grande surface est le polygone régulier.

En fait, à l'échelle du microscope optique, différentes morphologies peuvent être observées dont la signification clinique reste mal comprise. Ainsi, dans le cas de la whewellite, on observe des cristaux en lamelles empilées ou disposées de manière rayonnante (Figure 5A), des cristaux ovales à centre déprimé (Figure 5B) et des cristaux de forme beaucoup moins bien définie et agencés de façon

apparemment anarchique (figure 5C). De même pour la dihydroxyadénine, différentes formes cristallines ou différents agencements de cristaux sont observés (Figures 5D à F).

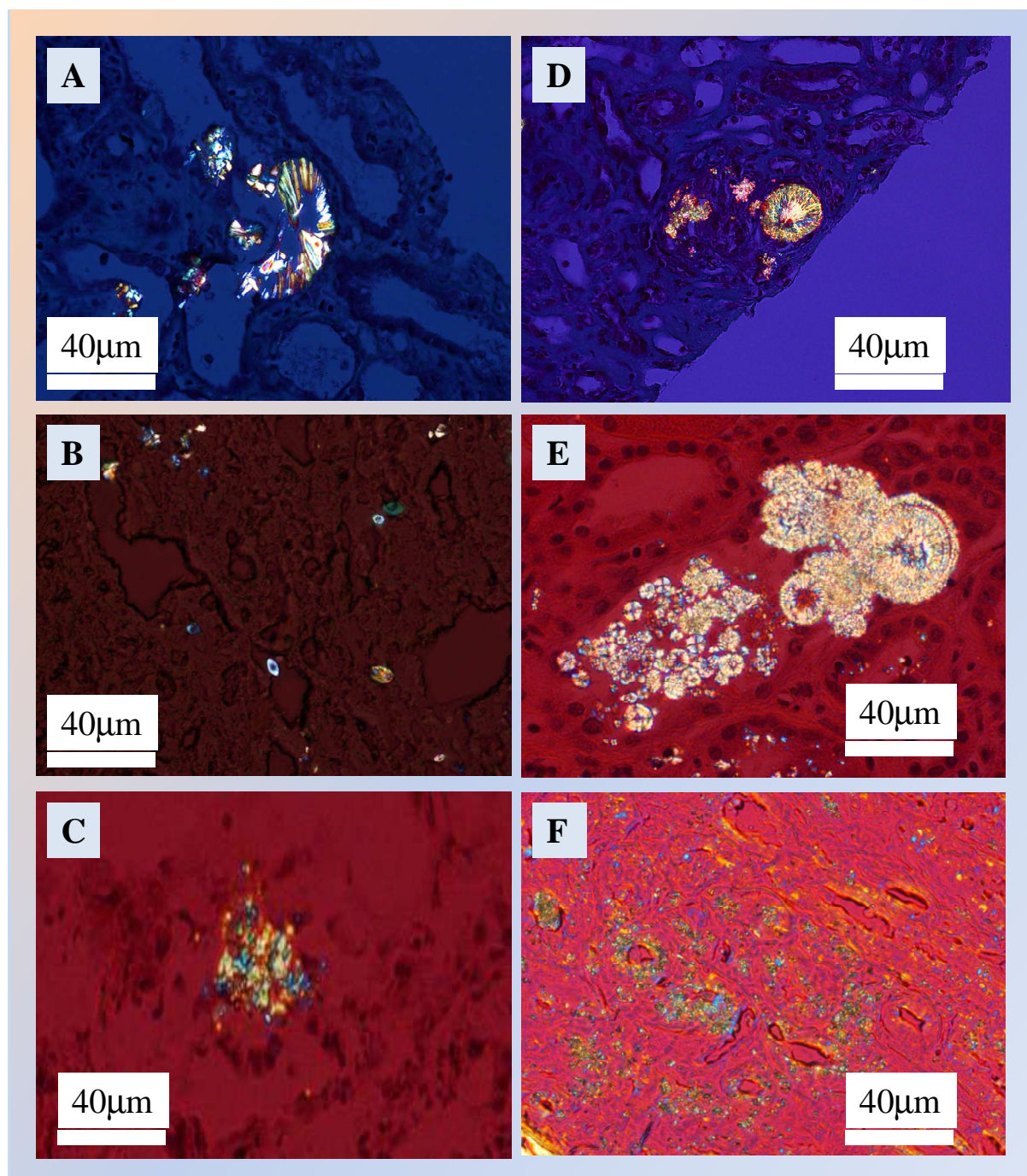


Figure 5. Différentes morphologies observées en microscopie optique pour deux espèces cristallines, la whewellite (A, B, C) et la dihydroxyadénine (D, E, F).

Or, il a été montré que certaines macromolécules, comme l'ostéopontine, pouvaient moduler la forme des cristaux précipités dans le tissu rénal [128]. Le fait qu'un faciès cristallin prédomine très fortement sur la biopsie rénale d'un patient alors qu'un autre faciès prédomine chez un autre patient suggère qu'au-delà de la sursaturation oxalocalcique nécessaire à la formation des cristaux, d'autres facteurs, notamment des modulateurs ou des inhibiteurs de cristallisation, interviennent, la morphologie des cristaux pouvant orienter vers un environnement particulier, peut-être révélateur d'un contexte pathologique différent. Cette diversité de structures peut être une source de difficultés diagnostiques lors de l'examen des coupes histologiques au microscope optique, même lorsque celui-ci est équipé de la polarisation. Ainsi, la figure 6 montre deux structures cristallines de morphologie très voisine en microscopie optique alors que l'analyse par microscopie infrarouge identifie des espèces cristallines très différentes et oriente vers des diagnostics étiologiques également très différents, une hyperoxalurie en cas de whewellite, un déficit en adénine phosphoribosyltransférase en cas de cristaux de dihydroxyadénine.

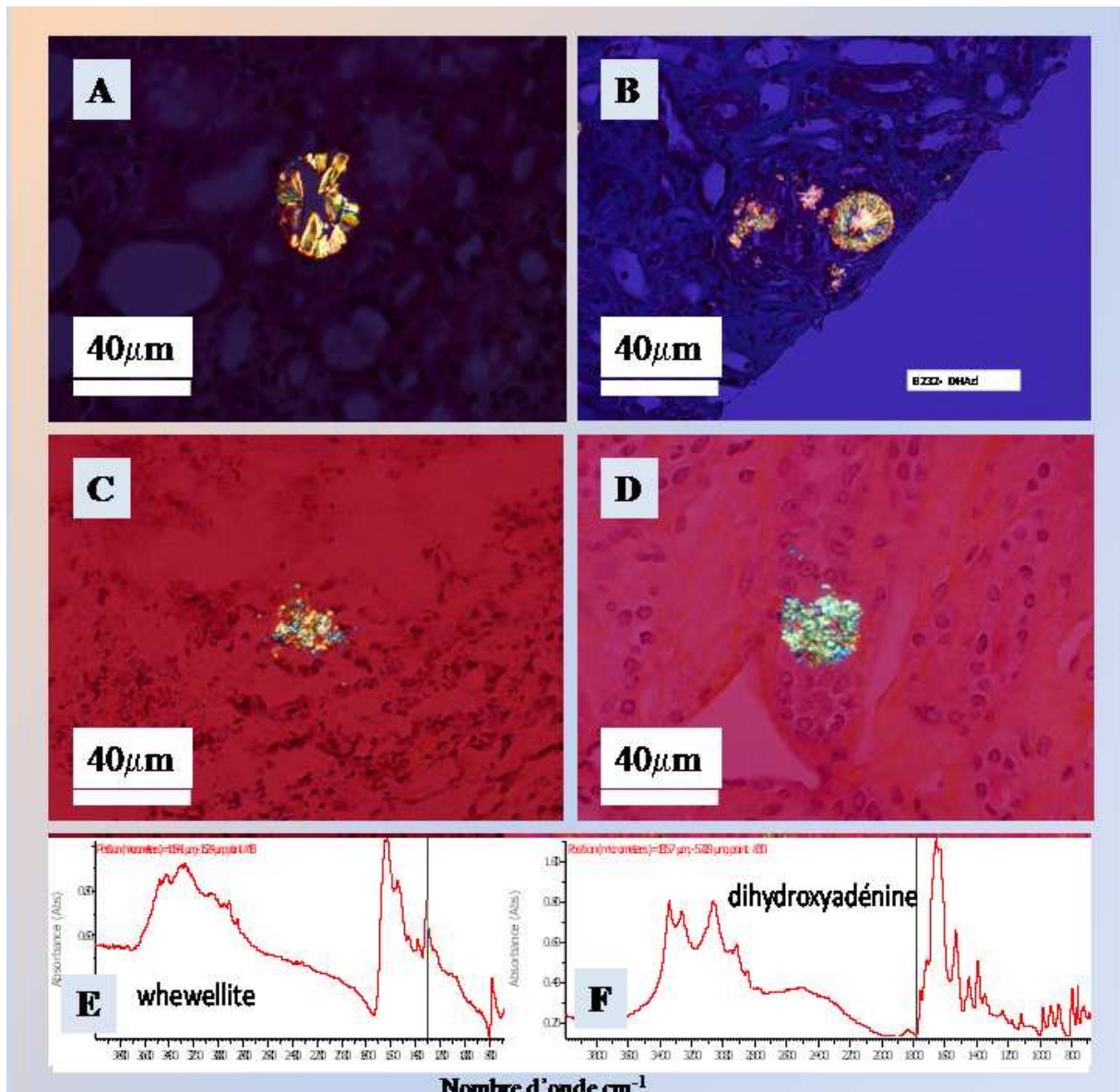


Figure 6. A, B, C et D : aspect des dépôts cristallins intrarénaux vus en microscopie optique à polarisation (A et C : whewellite ; B et D : dihydroxyadénine). E. Spectre infrarouge de whewellite obtenu sur les cristaux de la figure C. F : spectre infrarouge de la dihydroxyadénine obtenu sur les cristaux de la figure D. Noter que les morphologies des cristaux présentent de grandes similitudes sur les figures A et B d'une part, C et D d'autre part, rendant difficile leur reconnaissance par la simple observation.

Au travers de ces deux cas cliniques, nous voulons montrer la place que va prendre la caractérisation des cristaux par des techniques physiques dans l'étude des biopsies qu'elles soient rénales ou qu'elles proviennent d'autres organes. En effet, nous avons déjà souligné l'incapacité des techniques de coloration usuelle à préciser la nature chimique de ces dépôts, les spectres infra rouges collectés pour ces deux biopsies donnent sans équivoque leur nature chimique et oriente clairement vers deux pathologies distinctes.

Les premières observations concernant la morphologie des cristaux dans les tubes rénaux, peuvent s'effectuer simplement par microscopie optique. Les figures 5A et 5B montrent des clichés optiques où l'on peut remarquer une diversité au niveau de la morphologie de ces cristaux. Pour avancer sur cet axe de recherche, nous avons initié une étude par MEB des biopsies rénales (figure 7A). La microscopie électronique dévoile un premier jeu de morphologie pour les cristallites présents dans les dépôts constitués d'oxalate de calcium sachant qu'une même biopsie peut héberger différents types d'agencement pour les cristallites d'oxalate de calcium (Figures 7B, 7C, 7D et 7E). Notons que le couplage entre spectroscopie infrarouge (Figure 3B) et MEB (Figure 7A) nous permet ainsi d'aborder les deux caractéristiques majeures des calcifications pathologiques : leur nature chimique et la morphologie des cristallites qui les composent.

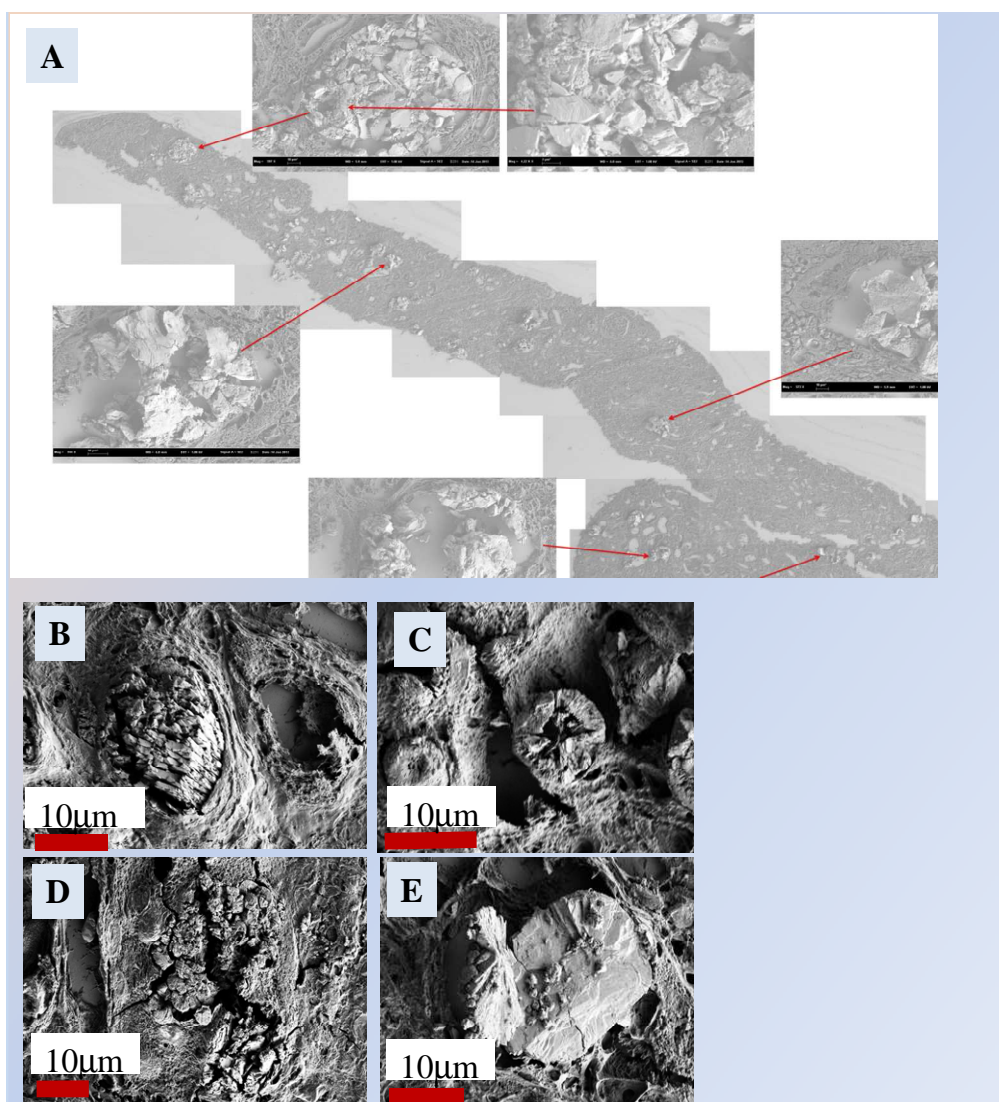


Figure 7. A) Cartographie effectuée par MEB à faible agrandissement d'une biopsie (B, C, D, E) différents clichés MEB effectués à fort grandissement montrant différents agencements de cristallites d'oxalate de calcium.

Finalement, il est important de remarquer que bien que constituées de la même phase chimique, l'oxalate de calcium monohydraté, les cinq sous-classes (Ia, Ib, Ic, Id et Ie) qui sont associées à des pathologies distinctes s'avèrent répondre à la lithotripsie de manière très différente. Nous avons montré que les calculs de ces cinq sous-classes sont associés à des cristallites dont les morphologies et/ou les agencements sont différents. Si ces différences structurales peuvent rendre compte des efficacités différentes observées vis-à-vis de la lithotripsie l'étude de la résistance mécanique des matériaux apporte quelques éléments de réponse [129]. Ainsi, des expériences de micro-indentations [130, 131] dévoilent toute l'importance de l'interface dans une structure en multicouche. Ainsi, une interface entre cristallites faible favorise la propagation des microfissures alors qu'une interface forte stoppe celles-ci [132]. Ces expériences nous conduisent à nous intéresser aux interfaces entre cristallites et donc à identifier précisément la partie organique présente entre les cristallites.

Sur les 232 biopsies analysées par ces techniques, la première information qui ressort est la diversité considérable des espèces cristallines mises en évidence dans le tissu rénal [46]. En effet, 22 corps différents ont été caractérisés (tableau 1). Cette diversité permet de comprendre la difficulté à poser un diagnostic si l'on utilise les colorations histologiques usuelles, celles-ci ne permettant pas de caractériser toutes les phases minérales ou organiques présentes dans les tissus. Seules des techniques physiques comme la microscopie infrarouge conduisent à des résultats tangibles. Or l'identification précise des phases cristallines est essentielle pour comprendre la pathologie qui en est responsable.

Composant identifié	Pur (%)	En association	Total
Whewellite	74 (54,0)	15	89 (48,1)
Weddellite	1 (0,7)	2	3 (1,6)
Carbapatite	24 (17,5)	26	50 (27,0)
Phosphate amorphe de Ca carbonaté	7 (5,1)	20	27 (14,6)
Phosphate octocalcique, 5 H ₂ O	1 (0,7)	0	1 (0,5)
Whitlockite	0	1	1 (0,5)
Struvite	0	1	1 (0,5)
Calcite	1 (0,7)	5	6 (3,2)
Silice opaline	2 (1,5)	0	2 (1,1)
Dihydroxy-2,8-adénine	13 (9,5)	1	14 (7,6)
Acide urique anhydre	1 (0,7)	0	1 (0,5)
Acide urique dihydraté	0	3	3 (1,6)
Acide urique amorphe*	0	4	4 (2,2)
Urate acide d'ammonium anhydre*	0	4	4 (2,2)
Urate acide de sodium monohydraté	0	3	3 (1,6)
Acide méthyl-1-urique	1	0	1 (0,5)
Cystine*	1	0	1 (0,5)
Foscarnet	6 (4,4)	1	7 (3,8)
Triamtérène	3	0	3 (1,6)
Indinavir	2	0	2 (1,1)
N-acétylsulfadiazine	0	1	1 (0,5)
Ciprofloxacine, sel de magnésium	0	1	1 (0,5)
Total	137	48 mélanges	185

* modèles animaux

Tableau I. Nature et fréquence des différents types de cristaux identifiés dans le tissu rénal

Ainsi, ces analyses montrent que certaines espèces sont associées à des contextes pathologiques très particuliers. Par exemple, le phosphate amorphe de calcium carbonaté n'a été identifié seul que dans des biopsies (protoculaires ou justifiées par une altération du greffon) chez des patients transplantés alors que la carbapatite a été observée dans un échantillon beaucoup plus large de situations pathologiques. La whitlockite n'a été décelée pour l'instant que dans les cristallisations phosphatiques de la médullaire profonde telles que les plaques de Randall. Le phosphate octocalcique pentahydraté, qui n'est pas stable au plan thermodynamique, permet de conclure à un processus de cristallisation rapide et récent. La silice opaline, de découverte fortuite grâce à l'analyse infrarouge, fait suspecter une charge chronique en dérivés du silicium qui sont nombreux et parfois abondants dans certains médicaments ou excipients médicamenteux qui sont connus pour donner parfois des calculs

[133-135]. L'acide méthyl-1 urique, métabolite de la caféine, n'a été observé que chez des patients présentant une surcharge aluminique, généralement d'origine thérapeutique. L'acide urique en tant que tel est plutôt rare dans le rein (deux observations seulement dans les biopsies d'origine humaine de notre série), mais il a été observé systématiquement dans un modèle de souris KO pour GLUT 9 développant une insuffisance rénale a priori obstructive. Cependant, la topographie des dépôts et leur nature selon les segments du rein où ils sont identifiés suggèrent que plusieurs mécanismes sont vraisemblablement impliqués dans l'altération de la fonction rénale.

L'intérêt clinique d'identifier correctement les cristaux présents dans le tissu rénal est d'essayer de comprendre quels facteurs étiopathogéniques sont impliqués dans la perte de fonction rénale, soit à des fins de diagnostic soit à des fins d'optimisation de la prise en charge thérapeutique lorsque la pathologie a été clairement identifiée. Par exemple, identifier des cristaux de whewellite chez un patient présentant une altération de la fonction rénale secondaire à une chirurgie bariatrique ou une résection étendue du grêle met en lumière le rôle de l'hyperoxalurie d'origine absorptive et peut conduire à modifier la prise en charge du patient. Identifier des cristaux de 2,-dihydroxyadénine dans la biopsie d'un sujet de 70 ans sans antécédents ayant dégradé récemment pour une raison inconnue sa fonction rénale, apporte non seulement un diagnostic étiologique mais également une solution thérapeutique qui, dans la majorité des cas, permet de restaurer ou de stabiliser au long cours la fonction rénale du patient. Dans d'autres cas, comme la présence de cristaux de calcite, d'acide méthyl-1 urique ou de silice opaline, le lien entre l'insuffisance rénale, la présence de cristaux et leur étiologie peut être plus difficile à établir ou nécessiter la prise en compte d'une conjonction de facteurs qui, isolément, ne sont pas connus pour entraîner une altération de la fonction rénale.

Conclusion et Perspectives

L'interface entre les deux communautés scientifiques, médicale et physicochimiste, a permis la mise en place d'outils de diagnostic originaux pour des pathologies génétiques sévères, infectieuses et environnementales. L'introduction des nouveaux concepts de chimie douce, des sciences de surface et de la nanochimie couplée à des techniques de physicochimie avancées, au sein même des services hospitaliers est désormais une réalité incontournable. Le succès rencontré pour la lithiase qui est désormais un examen de routine [136-139] s'affirme de plus en plus comme une réalité pour les pathologies microcristallines rénales. Plus de quatre cents patients ont bénéficié de cette approche et

les programmes de recherche en cours où l'on croise notamment la physicochimie à des échelles subcellulaires et les données cliniques des patients greffés devraient sans aucun doute aboutir à des avancées significatives dans l'épidémiologie et la compréhension des processus biochimiques associés aux calcifications pathologiques. Dans cette dynamique, d'autres pathologies microcristallines majeures sont désormais abordées. Depuis notre première expérience sur soleil [64], les derniers développements réalisés sur des grands instruments comme le synchrotron SOLEIL, la source Européenne ESRF et le laboratoire L. Brillouin tiennent et vont tenir une place de première importance dans cette recherche [140].

Conflits d'intérêt : aucun

Remerciements

Nous tenons à remercier tout particulièrement le Prof. R. Bayahia (CHU Ibn Sina, Rabat, Maroc), Prof. I. Brocheriou (Hôpital Tenon, Paris), Dr. X. Carpentier (Hopital Pasteur, Nice), Dr. Ch. Chappard (Hôpital Lariboisière, Paris), Prof. P. Conort (CHU Pitié Salpêtrière, Paris), Dr. P. Dorfmüller (CHU Pitié Salpêtrière, Paris), Dr E. Estève (Hôpital Necker, Paris), Prof. D. Hannouche (Hôpital Lariboisière, Paris), Dr S. El Kabbaj (LRAM de la Gendarmerie Royale, Rabat, Maroc), Prof. P. Jungers (Hôpital Necker, Paris), Prof. B. Knebelmann (Hôpital Necker, Paris), Dr. E.A. Korn (Hôpital Lariboisière, Paris), Dr E. Letavernier (Hôpital Tenon, Paris), Prof J.Ph. Haymann (Hôpital Tenon, Paris), Prof. F. Lioté (Hôpital Lariboisière, Paris), Prof. M. Mathonnet (Hôpital de Limoges), Dr F. Meiouet (LRAM de la Gendarmerie Royale, Rabat, Maroc), Prof. P. Méria (Hôpital St Louis, Paris), Dr. Ch. Nguyen (Hôpital Lariboisière, Paris), Prof. P. Ronco (Hôpital Tenon, Paris) Dr. I. Tostivint (CHU Pitié Salpêtrière, Paris), Prof. O. Traxer (Hôpital Tenon, Paris) et Prof. J.C. Williams (Department of Anatomy and Cell Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA) pour une série de discussions très informatives.

De plus, cette recherche dédiée aux calcifications pathologiques n'aurait pu aboutir sans le concours du Dr. P.-A. Albouy (LPS, Université Paris XI, Orsay), Dr. G. André (LLB, CEA, Saclay), Dr S. Bertozzo (Imperial College, London, England), Dr. A. Bianchi (INSERM-U7561), Dr J. Blaise-Brubach (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Dr. P. Chevallier (LURE, Université Paris XI, Orsay), Dr Ch. Combes (CIRIMAT, Toulouse), Dr. A. Cousson (LLB, CEA, Saclay), Dr F. Damay (LLB, CEA, Saclay), Dr M. Duer (Cambridge university, England), Dr. P. Dumas (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Dr. B. Fayard (ESRF-LPS, Grenoble), Dr. F. Fayon (CEHMTI, Orléans), Dr. E. Foy (Laboratoire Pierre Süe, CEA, Saclay), Dr. J. Frederick (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Dr. J.L. Hazemann (ESRF, Grenoble), Dr. A. Lebail (Laboratoire des fluorures, Le Mans), Dr. F. Lenaour (Hôpital Paul Brousse, Villejuif), Prof. J. Livage (Collège de France, Paris), Dr. O. Mathon (ESRF, Grenoble), Dr. G. Matzen (CEHMTI, Orléans), Dr. Ch. Mocuta (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin),

Dr. M. Refringiers (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Dr. S. Reguer (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Pr Ch. Rey (CIRIMAT, Toulouse), Pr P. Ronco (Hôpital Tenon, Paris), Dr. S. Rouzière (LPS, Université Paris XI, Orsay), Dr P. Roy (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Dr. J.P. Samama (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Prof. C. Sanchez (Collège de France, Paris), Dr. Ch. Sandt (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Dr. D. Thiaudière (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin), Dr. E. Véron (CEHMTI, Orléans), Dr. R. Weil (LPS, Orsay) sans oublier les chercheurs du LCMCP (Paris).

Cette recherche a été soutenue par les instituts de Physique et de Chimie du CNRS ainsi que par deux ANR blanches (ANR-09-BLAN-0120-02, ANR-12-BS08-0022-03), un projet Cordim et un projet émergence de l'Université Pierre et Marie Curie.

Références

1. Bazin D, Daudon M, Combes Ch, Rey Ch. Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications. *Chem Rev* 2012; 112: 5092 – 120.
2. Bazin D, Daudon M, Pathological calcifications and selected examples at the medicine–solid-state physics interface, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2012 ; 45 : 383001 - 10.
3. Bazin D, Daudon M, Nouvelles Méthodes d'étude des calculs et plaques de Randall, Actualités Néphrologiques, Jean Hamburger, Ed. Flammarion – Médecine (2010). pp.75-98 et 277-280
4. Daudon M, Bazin D, "New techniques to characterize kidney stones and Randall's plaque" in "Urolithiasis : Basic Science and Clinical Practice" (Eds.) J.J. Talati, H.G. Tiselius, D.M. Albala, Z. Ye, Ed. Springer, 2012.
5. Daudon M, Traxer O, Jungers P. Lithiase urinaire. 2d édition. Médecine-Sciences, Lavoisier, Paris, 2012.
6. Stratta P, Fogazzi GB, Canavese C, *et al.* Decreased kidney function and crystal deposition in the tubules after kidney transplant. *Am J Kidney Dis* 2010; 56: 585-90.
7. Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate, *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S300.
8. Cox RF, Morgan MP, Microcalcifications in breast cancer: Lessons from physiological mineralization, *Bone* 2013; 53: 437- 50.
9. Carpentier X, Daudon M, Traxer O, *et al.* Relationships between carbonation rate of carboxapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology. *Urology* 2009; 73: 968 – 75.
10. Daudon M, Lacour B, Jungers P, High prevalence of uric acid calculi in diabetic stone formers, *Nephrol Dial Transplant* 2005 ; 20 : 468 - 69.
11. Daudon M, Jungers P, Bazin D. Peculiar morphology of stones in primary hyperoxaluria, *New Engl J Med* 2008 ; 359 : 100-2.
12. Estepa-Maurice L, Hennequin C, Marfisi C, Bader C, Lacour B, *et al.* Fourier Transform infra red microscopy identification of crystal deposits in tissues. *Am J Clin Path* 1996 ; 105: 576-82.
13. Anderson J, Dellomo J, Sommer A, Evan A, Bledsoe S, A concerted protocol for the analysis of mineral deposits in biopsied tissue using infrared microanalysis, *Urol Res* 2005; 33, 213-19.
14. Roger Qiu S, Orme CA, Dynamics of Biomineral Formation at the Near-Molecular Level, *Chem. Rev.* 2008 ; 108 : 4784 - 822.
15. Noguera C, Fritz B, Clément A, Baronnet A Nucleation, growth and ageing in closed systems I : a unified model for precipitation in solution, condensation in vapor phase and crystallization in the melt. *J. of Crystal Growth* 2006 ; 297 : 180-186.
16. Noguera C, Fritz B, Clément A, Baronnet A Nucleation, growth and ageing in closed systems II : dynamics of formation of a new phase. *J. of Crystal Growth* 2006 ; 297 : 187-198.
- Noguera C, Fritz B, Clément A. A theoretical treatment of the precipitation of doubly substituted solid solutions in aqueous solutions, *Crystal Growth & Design* 2012; 12: 3444 - 57.
16. Fritz B, Clément A, Amal Y, Noguera C, Simulation of the nucleation and growth of simple clay minerals in weathering processes : the Nanokin code. *Geochimica et Cosmochim.* 2009; 73 : 1340 - 58.
17. Fritz B, Clément A, Amal Y, Noguera C. Simulation of the nucleation and growth of simple clay minerals in weathering processes : the NANOKIN Code. *Geochimica et Cosmochim. Acta.* 2009 ; 73 : 1340-1358.
18. Kircelli F, Peter ME, Sevinc OE, Celenk FG, Yilmaz M, Steppan S, *et al.* Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrol Dial Transplant* 2012 ;27(2) : 514 - 21.
19. Louvet L, Buchel J, Steppan S, Passlick-Deetjen J, Massy ZA. Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 2013 ; 28(4) : 869-78.

20. Conti C, Brambilla L, Colombo C, *et al.* Stability and transformation mechanism of weddellite nanocrystals studied by X-ray diffraction and infrared spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010 ; 12 : 14560-6.
21. Di Tommaso D, Ruiz Hernández SE, Du Z, de Leeuw NH. Density functional theory and interatomic potential study of structural, mechanical and surface properties of calcium oxalate materials, *RSC Adv.* 2012; 2: 4664-4674.
22. Fei T, Hao X, Su Bao-Lian S. A simultaneous thermal study in quantitative analysis of calcium oxalate hydrates, *Anal. Methods*, 2013; 5: 6900 - 3.
23. Conti C, Casati M, Colombo C, Realini M, Brambilla L, Zerbi G. Phase transformation of calcium oxalate dihydrate–monohydrate: Effects of relative humidity and new spectroscopic data, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014 ; 128 : 413-9.
24. Hassan N, Cabuil V, Abou-Hassan A. Microfluidic assisted assembly of fluorescent, plasmonic and magnetic nanostructures, *Angewandte Chem. Inter. Ed.* 2013 ; 52: 1994 - 97.
25. Gomes S, Nedelec JM, Renaudin G. On the effect of temperature on the insertion of zinc into hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia* 2012 ; 8 : 1180-9.
26. Gomes S, Kaur A, Nedelec JM, Renaudin G. X-ray absorption spectroscopy shining (synchrotron) light onto the insertion of Zn²⁺ in calcium phosphate ceramics and its influence on their behaviour under biological conditions, *J Mater Chem B*, 2014, 2, 536-45.
27. Preitner F, Laverriere-Loss A, Metref S, *et al.* Urate-induced acute renal failure and chronic inflammation in liver-specific Glut9 knockout mice, *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305 : F786–F795.
28. Livrozet M, Vandermeersch S, Mesnard L, *et al.* A novel model of type A cystinuria due to spontaneous mutation in 129S2/SvPasCrl mice, *Soumis PlosOne*.
29. Blaschko SD, Miller J, Chi T, *et al.* Microcomposition of human urinary calculi using advanced imaging techniques, *J Urol* 2013 ; 189 : 726-734.
30. Ea HK, Nguyen C, Bazin D, *et al.* Articular cartilage calcification in osteoarthritis insights into crystal-induced stress. *Arthritis Rheum* 2011;63:10-8.
31. Nguyen Ch, Ea HK, Thiaudière D, *et al.* Calcifications in human osteoarthritic articular cartilage: ex vivo assessment of calcium compounds using XANES spectroscopy, *J Synchrotron Radiat* 2011; 18, 475 - 480
32. Nguyen Ch, Bazin D, Daudon M, *et al.* Revisiting spatial distribution and biochemical composition of calcium-containing crystals in human osteoarthritic articular cartilage, *Arthritis Research & Therapy* 2013; 15 : R103.
33. Ea HK, Chobaz V, Nguyen Ch, *et al.* Pathogenic role of basic calcium phosphate crystals in destructive arthropathies, *PLoS ONE* 2013 ; 8 : e57352.
34. Daudon M, Jungers P, Bazin D. Stone Morphology: Implication for Pathogenesis, *AIP Conf. Proc.* 2008; 1049 : 199 - 215.
35. Daudon M, Traxer O, Jungers P, Bazin D. Stone Morphology Suggestive of Randall's Plaque, *AIP Conf. Proc.* 2007; 900 : 27 - 34.
36. Daudon M, Bouzidi H, Bazin D. Composition and morphology of phosphate stones and their relation with etiology, *Urol Res* 2010 ; 38 : 459 – 67.
37. Dessombz A, Méria P, Bazin D, *et al.* Diversité chimique des calculs prostatiques : une investigation par MEB et spectroscopie infrarouge. *Prog Urol* 2011 ; 21 : 940 - 5.
38. Dessombz A, Méria P, Bazin D, Daudon M. Prostatic stones : evidence of a specific chemistry related to infection and presence of bacterial Imprints, *PLoS ONE* 2012 ; 7 : e51691.
39. Dorfmueller P, Bazin D, Aubert S, *et al.* Crystalline ultrastructures, inflammatory elements, and neoangiogenesis are present in inconspicuous aortic valve tissue. *Cardiol Res Pract* 2010. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/685926> ([article ID 685926, 7 pages]).
40. Cloyd KL, El-Hamamsy I, Boonrungsiman S *et al.*, Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell ‘calcified’ nodules, *PLoS ONE* 2012 ; 7 : e48154.
41. Brisset F, Repoux M, Ruste J, Grillon F, Robaut F., *Microscopie électronique à balayage et Microanalyses*, EDP Sciences, 2009. ISBN : 978-2-7598-0082-7.
42. Daudon M, Bazin D, Jungers P, *et al.* Opportunities offered by scanning electron microscopy, powder neutron diffraction in the study of whewellite kidney stones, *J. App. Cryst.* 2009 ; 42 : 109-15.

43. Zhang G-N, Ouyang J-M, Xue J-F, Shang Y-F, Property changes of urinary nanocrystallites and urine of uric acid stone formers after taking potassium citrate, *Materials Science and Engineering: C*, 2013 ; 33 : 4039-45.
45. Jacob DE, Grohe B, Geßner M, Beck BB, Hoppe B, Kidney Stones in Primary Hyperoxaluria: New Lessons Learnt, *PLoS ONE* 2013; 8(8) : e70617.
46. Dessombz A, Bazin D, Dumas P, Sandt Ch, Sule-Suso J, Daudon M. Shedding light on the chemical diversity of ectopic calcifications in kidney tissues : Diagnostic & Research Aspects, *PLoS ONE* 2011 ; 6 : e28007 – e28010.
47. Wilson EV, Bushiri MJ, VaidyanVK. Characterization and FTIR spectral studies of human urinary stones from Southern India, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010 ; 77 : 442-45.
48. Yusenko EV, Yusenko KV, Korolkov IV, *et al.* High-throughput powder X-ray diffraction, IR-spectroscopy and ion chromatography analysis of urinary stones: A comparative study, *Central European J Chemistry* 2013 ; 11 : 2107-19.
49. Pucetaite M, Tamosaityte S, Engdahl A, Ceponkus J, Sablinskas V, Uvdal P. Microspectroscopic infrared specular reflection chemical imaging of multi-component urinary stones: MIR vs. FIR, *Central European J Chemistry* 2014 ; 12 : 44-52.
50. Ghosh S, Basu S, Chakraborty S, Mukherjee AK. Structural and microstructural characterization of human kidney stones from eastern India using IR spectroscopy, scanning electron microscopy, thermal study and X-ray Rietveld analysis, *J Appl Cryst* 2009; 42: 629-35.
51. Bazin D, Chevallier P, Matzen G, Jungers P, Daudon M. Heavy elements in urinary stones. *Urol Res* 2007;35:179-84.
52. Kuta J, Machát J, Benová D, Červenka R, Zeman J, Martinec P. Association of minor and trace elements with mineralogical constituents of urinary stones: A hard nut to crack in existing studies of urolithiasis, *Environmental Geochemistry and Health* 2013 ; 35 : 511-22.
53. Carpentier X, Bazin D, Combes Ch, *et al.* High Zn content of Randall's plaque: A μ -X-ray fluorescence investigation, *J Trace Elements in Medicine and Biology* 2011 ; 25 : 160 - 5.
54. Sayers DE, Stern EA, Lytle FW. New technique for investigating noncrystalline structures : Fourier analysis of the extended X-Ray absorption fine structure. *Phys Rev Let* 1971 ; 27 : 1204-7.
55. Bazin DC, Sayers DA, Rehr JJ. Comparison between X-ray absorption spectroscopy, anomalous wide angle X-ray scattering, anomalous small angle X-ray scattering, and diffraction anomalous fine structure techniques applied to nanometer scale metallic clusters, *J. Phys. Chem. B* 1997 ; 101 : 11040-50.
56. Bazin D, Rehr J. Soft X-ray absorption spectroscopy at the cutting edge for nanomaterials used in heterogeneous catalysis: the state of the art, *Catalysis Letters* 2003 ; 87 : 85-90.
57. Bazin D, Rehr JJ, Limits and advantages of Xanes for nanometer scale metallic clusters. *J Phys Chem B* 2003 ; 107: 12398-12402.
58. Bazin D, Guzzi L, Soft X-ray absorption spectroscopy in heterogeneous catalysis. *Applied Catalysis A* 2001 ; 213: 147-162.
59. Bazin D, Lynch J, Rarnos-Fernandez M, X-ray absorption spectroscopy and anomalous wide angle X-ray scattering: Two basic tools in the analysis of heterogeneous catalysts. *Oil & Gas Science and Technology-Revue D Ifp Energies Nouvelles* 2003 ; 58 : 667-683.
60. Garino C, Borfecchia E, Gobetto R, Van Bokhoven JA, Lamberti C. Determination of the electronic and structural configuration of coordination compounds by synchrotron-radiation techniques, *Coordination Chemistry Reviews*, In Press.
61. Rajendran J, Gialanella S, Aswath PB. XANES analysis of dried and calcined bones, *Materials Science and Engineering: C*, 2013 ; 33 : 3968 - 79.
62. Siritapetawee J, Pattanasiriwisawa W. An attempt at kidney stone analysis with the application of synchrotron radiation, *J Synchrotron Radiat* 2008 ; 15 : 158-61.
63. Blaschko SB, Chi T, Miller J, *et al.* Strontium substitution for calcium in lithogenesis, *J Urol* 2013 ; 189 : 735-39.
64. Bazin D, Carpentier, Traxer O, *et al.* Very first tests on SOLEIL regarding the Zn environment in pathological calcifications made of apatite determined by X-ray absorption spectroscopy, *J Synchrotron Radiat* 2008 ; 15 : 506 - 9.

65. Bazin D, Carpentier X, Brocheriou I *et al.* Revisiting the localisation of Zn²⁺ cations sorbed on pathological apatite calcifications made through X-ray absorption spectroscopy *Biochimie* 2009 ; 91 : 1294 - 300.
66. Carpentier X, Bazin D, Jungers P, Reguer S, Thiaudière D, Daudon M. The pathogenesis of Randall's plaque: a papilla cartography of Ca compounds through an ex vivo investigation based on XANES spectroscopy, *J Synchrotron Radiat* 2010 ; 17 : 374 - 9.
67. Bazin D, Daudon M, Chappard Ch, Rehr JJ, Thiaudiere D, Reguer S. The status of strontium in biological apatites: an XANES investigation, *J Synchrotron Radiat* 2011 ; 18 : 912-20.
68. Bazin D, Dessombz A, Nguyen Ch, *et al.* The status of strontium in biological apatites: an XANES/EXAFS investigation, *J Synchrotron Radiat* 2014 ; 21 : 136 - 42.
69. Carpentier X, Daudon M, Traxer O, *et al.* Relationships between carbonation rate of carbapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology, *Urology* 2009 ; 73 : 968 - 75.
70. Bazin D, André G, Weil R, *et al.* Absence of bacterial imprints on struvite-containing kidney stones: A structural investigation at the mesoscopic and atomic scale, *Urology* 2010; 79 : 786 - 90.
71. Bazin D, Daudon M, André G, Weil R, Véron E, Matzen G. Therapy modifies cystine kidney stones at the macroscopic scale. Do such alterations exist at the mesoscopic and nanometer scale ? *J. Appl. Cryst.* 2014 ; 47 : 719-25.
72. Daudon M, Bazin D, Adil K, Le Bail A. 7,9-Bis(hydroxymethyl)-7H-purine-2, 6, 8 (1H, 3H, 9H) trione, *Acta Cryst.* 2011; E67 : o1458
73. Le Bail A, Bazin D, Daudon M, Brochot A, Robbez-Masson V, Maisonneuve V. Racemic calcium tartrate tetrahydrate [form (II)] in rat urinary stones, *Acta Cryst.* 2009 ; B65 : 350 – 4.
74. Le Bail A, Daudon M, Bazin D. A new compound in kidney stones? Powder X-ray diffraction study of calcium glycinate trihydrate, *Acta Cryst.* 2013 ; C69 : 734 - 7.
75. Colas H, Bonhomme-Courry L, Coelho Diogo C, *et al.* Whewellite, CaC₂O₄·H₂O: structural study by a combined NMR, crystallography and modelling approach, *Cryst. Eng. Comm.* 2013, 15, 8840 - 7.
76. Burgess KMN, Xu Y, Leclerc MC, Bryce DL. Alkaline-Earth Metal Carboxylates Characterized by ⁴³Ca and ⁸⁷Sr Solid-State NMR: Impact of Metal-Amine Bonding, *Inorg. Chem.* 2014 ; 53 :552–61
77. Bonhomme Ch, Gervais Ch, Laurencin D. Recent NMR developments applied to organic–inorganic materials, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2014 ; 77 : 1-48.
78. Williams Jr. JC, Hameed T, Jackson ME, *et al.* Fragility of Brushite Stones in Shock Wave Lithotripsy: Absence of Correlation with Computerized Tomography Visible Structure, *J Urol* 2012 ; 188 : 996-1001.
79. Štěpánková K, Novotný K, Vašinová Galiová M, Kanický M, Kaiser J, Hahn DW. Laser ablation methods for analysis of urinary calculi: Comparison study based on calibration pellets, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2013 ; 81 : 43-9.
80. Williams JC Jr., McAteer JA, Evan AP, Lingeman JE. Micro-computed tomography for analysis of urinary calculi. *Urol Res* 2010 ; 38 : 477-84.
81. Livage J, Sanchez C. Sol-gel chemistry. *J Non Crystalline Solids* 1992 ; 145 : 11-9.
82. J. Livage. Cours du Collège de France, <http://www.labos.upmc.fr/lcmcp/?q=taxonomy/term/445>
83. C. Sanchez, Cours du Collège de France, <http://www.college-de-france.fr/site/clement-sanchez/index.htm#course>.
84. De Gennes PG. Nobel lecture, 1991, accessible sur http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1991/gennes-lecture.html
85. Casagrande C., Veyssié M. Janus beads-realization and 1st observation of interfacial properties, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1998 ; 306 : 1423-5.
86. Perro A, Reculosa S, Bourgeat-Lami E, Ravaine R, Duguet E. Les particules mettent les formes. II - Quand le dieu romain Janus inspire les scientifiques, *Actual Chim* 2010 ; 340 : 14-17.
87. Sanchez C, Soler-Illia GJ de AA, Ribot F, Lalot T, Mayer CR, Cabuil V. Designed hybrid organic-Inorganic nanocomposites from functional nanobuilding blocks. *Chem Mater* 2001 ; 13 : 3061- 65.
88. Mann S, Burkett SL, Davis SA, *et al.* Sol-Gel Synthesis of Organized Matter, *Chem Mater* 1997 ; 9 : 2300- 10.
89. Antonietti M, Ozin GA. Promises and problems of mesoscale materials chemistry or why Meso?, *Chem Eur J* 2004; 10 : 28-41.

90. Daudon M, Traxer O, Williams JC, Bazin D. Randall's Plaques, In : Rao PN, Preminger GM, Kavanagh JP, eds. Urinary tract stone disease, Springer, London, 2011: pp.103-112.
91. Ferey G, Hybrid Porous Solids: Past, Present, Future. *Chem. Soc. Rev.* 2008 ; 37 : 191-241.
92. Guo S, Ward MD, Wesson JA. Direct visualization of calcium oxalate monohydrate crystallization and dissolution with atomic force microscopy and the role of polymeric additives, *Langmuir* 2002, 18, 4284 - 91.
93. Letavernier E, Traxer O, Haymann JP, Bazin D, Daudon M. Cystinurie, *Prog Urol FMC* 2012 ; 22 : F119 - 23.
94. Bazin D, Daudon M, Chevallier P, Rouzière S, *et al.* Les techniques de rayonnement synchrotron au service de la caractérisation d'objets biologiques : un exemple d'application, les calculs rénaux, *Ann Biol Clin* 2006 ; 64 (2) : 125-39.
95. Herschel W, Dreyer JLE. The Scientific Papers of Sir William Herschel, Royal Society and Royal Astronomical Society, London, 1912.
96. Chamberlain J. *The principles of interferometric spectroscopy*, Ed. Wiley, 1979.
97. Griffiths PR, Haseetha JA. F.T.-I.R. spectroscopy in chemical analysis: a series of monographs on analytical chemistry and its applications. Ed. Wiley 1986; 38.
98. Carr GL, Resolution limits for infrared microspectroscopy explored with synchrotron radiation. *Rev. Sci. Instrum.* 2001 ; 72 : 1613 – 9.
99. Williams GP. Infrared synchrotron radiation instrumentation and applications. *Rev. Sci. Instrum.* 1992 ; 63 : 1535 – 45.
100. Baudalet F. *Des synchrotrons et 100 ans d'histoire*, CNRS éditions, sous presse.
101. <http://www.synchrotron-soleil.fr/>
102. Miller LM, Dumas P. Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. *Biochim Biophys Acta* 2006 ; 1758 : 846 - 57.
103. Draux F. Analyse de la cellule tumorale et de son interaction avec un agent anticancéreux : approche biophotonique par *microspectroscopies* RAMAN et infra rouge, PhD, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2009.
104. Kendall C, Isabelle M, Bazant-Hegemark F, *et al.* Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics, *Analyst* 2009 ; 134 : 1029 – 45.
105. Le Naour F, Sandt Ch, Peng Ch, *et al.* In situ chemical composition analysis of cirrhosis by combining synchrotron Fourier transform infrared and synchrotron μ X-ray fluorescence microspectroscopies on the same tissue section, *Anal Chem* 2012 ; 84 : 10260 - 6.
106. Bazin D, Haymann J.-Ph., Letavernier E, Rode J, Daudon M. Pathological calcifications : a medical diagnosis based on *their* physico-chemical properties, *Presse Méd* 2014 ; 43 : 135-48.
107. Daudon M. Comment *utiliser* les résultats de l'analyse morphologique et infrarouge des calculs en pratique clinique ? *Feuill Biol* 2003 ; 44 :19-25.
108. Maurice-Estépa L, Levillain P, Lacour B, Daudon M. Advantage of zero-crossing-point first-derivative spectrophotometry for the quantification of calcium oxalate crystalline phases by infrared spectrophotometry. *Clin Chim Acta* 2000 ; 298 : 1-11.
109. Daudon M, Protat MF, Réveillaud RJ, Jaeschke-Boyer H. Infrared spectrometry and Raman microprobe in the analysis of urinary calculi. *Kidney Int* 1983 ; 23 : 842-50.
110. Nguyen Quy, D; Daudon, M *Infrared et Raman Spectra of Calculi*; Elsevier: Paris, 1997.
111. Fowler BO. Infrared studies of apatites I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatite utilizing isotopic substitution, *Inorg Chem* 1974 ; 13: 194-207.
112. Von Ardenne M, Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen. *Z. Phys* 1938 ; 109 : 553 - 572.
113. Chrétien FC, Berthou J, Driguez PA. Dégradation des DIU in utero en fonction du temps, le phénomène de calcification, étude radiocristallographique et au microscope électronique à balayage, *Gyn Obstet Fertil* 2001 ; 30 : 1 – 13.
114. Paek LS, Tétéreault-Paquin JO, St-Jacques S, Nelea M, Danino MA. Le microscope électronique à balayage environnemental est-il un outil pertinent pour l'analyse des capsules périprothétiques mammaires ? *Annales de chirurgie plastique esthétique* 2013 ; 58 : 201–7.

- 115.** Mavrilas D, Apostolaki A, Kapolos J, *et al.* Development of bioprosthetic heart valve calcification in vitro and in animal models: morphology and composition, *J Crystal Growth* 1999; 205: 554 - 62.
- 116.** Werner L, Hunter B, Stevens S, Chew JL, Mamalis N. Role of silicon contamination on calcification of hydrophilic acrylic intraocular lenses, *Am. J. of Ophthalmology* 2006 ; 141 : 35-43.
- 117.** Lei L, Liu X, Shen YY, *et al.* Zero-order release of 5 fluorouracil from PCL-based films featuring trilayered structures for stent application, *Eur J Pharmaceutics Biopharmaceutics* 2011 ; 78 : 49 – 57.
- 118.** Rouprêt M, Daudon M, Hupertan V, Gattegno B, Thibault Ph, Traxer O. Can ureteral stent encrustation analysis predict urinary stone composition? *Urology* 2005 ; 66 : 246–251.
- 119.** Van Meerssche M, Feneau-Dupont J, Introduction à la Cristallographie et à la Chimie Structurale. Louvain, Ed. Cesson : Vander, 1973.
- 120.** Dahaoui S, Pichon-Pesme V, Howard JAK, Lecomte C. CCD charge density study on crystals with large unit cell parameters: the case of hexagonal L-cystine, *J Phys Chem.A* 1999 ; 103 : 6240-50.
- 121.** Nenow D, Vitko L. Effect of the opposite directions on the crystal face upon the growth kinetics of weddellite, *J Cryst Growth* 1977 ; 182 : 461 - 4.
- 122.** Daudon P, Bader CA, Jungers P. Urinary calculi – review of classification methods and correlations with etiology. *Scann Microsc* 1993; 7: 1081 - 106.
- 123.** Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- 124.** Bazin D, Chappard C, Combes C, *et al.* Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise, Bones, *Osteoporos Int.* 2009 ; 20 : 1065 - 75.
- 125.** Jauregui-Zuniga D, Reyes-Grajeda JP, Moreno A. Modifications on the morphology of synthetically-grown calcium oxalate crystals by crystal-associated proteins isolated from bean seed coats (*Phaseolus vulgaris*), *Plant Science* 2005 ; 168 : 1163 - 69.
- 126.** Pansu P (communication personnelle).
- 127.** <http://www.univ-orleans.fr/irem/modules/news/documents/Aires%20-%203.pdf>
- 128.** Okada A, Nomura S, Saeki Y, *et al.* Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney, *J Bone Miner Res* 2008 ; 23 : 1629-37.
- 129.** Brechet Y. La science des matériaux : du matériau de rencontre au matériau sur mesure, Cours du collège de France - 2013. <http://www.college-de-france.fr/site/college/>
- 130.** Miserez A, Weaver JC, Thurner Ph, *et al.* Cellulose fibrils direct plant organ movements *Adv. Func. Mater.* 2008 ; 18 : 1905 - 11.
- 131.** Zamiri A, De S. Mechanical properties of hydroxyapatite single crystals from nanoindentation data, *J Mechanical Behavior Biomed Materials* 2011; 4 :146-52.
- 132.** Fratzl P, Gupta HS, Fischer FD, Kolednik O. Hindered crack propagation in materials with periodically varying Young's modulus - Lessons from biological materials *Advanced Materials* 2007 ; 19 : 2657-61.
- 133.** Levison DA, Crocker PR, Banim S, Wallace DM. Silica stones in the urinary bladder. *Lancet* 1982; 1:704-5.
- 134.** Augusti M, Mikaelian JC, Monsaint JC, Brin D, Daudon M. Un calcul urinaire de silice secondaire à l'absorption de Gélolpectose chez un enfant. *Prog Urol* 1993; 3: 812-815.
- 135.** Ulinski, T; Sabot, JF; Bournon, I; Cochat, P, Bilateral urinary calculi after treatment with a silicate-containing milk thickener, *Euro. J. Pedia.*, 2004, 163-4-5, 239-240.
- 136.** Daudon M, La cristallurie : un marqueur diagnostique et pronostique des pathologies cristallo-gènes et des lithiases rénales, *Revue Francophone des Laboratoires*, 2013; 2013 : 67-73
- 137.** Daudon M. Cinq calculs - cinq photos - cinq diagnostics - cinq astuces *Progrès en Urologie - FMC*, 2012 ; 22 : F87-F93.
- 138.** Daudon M. Épidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France, *Annales d'Urologie*, 2005 ; 39 : 209-231
- 139.** Gràcia-Garcia S, Millán-Rodríguez F, Rousaud-Barón F, *et al.* Why and how we must analyze urinary calculi, *Actas Urol Esp (English Edition)*, 2011; 35: 354-62.

140. Daudon M, Bazin D. When the Synchrotron radiations highlight the Randall's plaques and kidney concretions, *J. Phys.: Conf. Ser.* 2013 ; 425 : 022006.