



Par MARCEL COCUBE (Paris, le 22 Juin 1998)

SOMMAIRE

[Présentation Générale \(M. Cocude\)](#)

[Données Scientifiques](#)

[Matériels et Méthodes Utilisées](#)

[Corrélation entre Structure Chimique de l'Additif et Image](#)

[Applications Médicales](#)

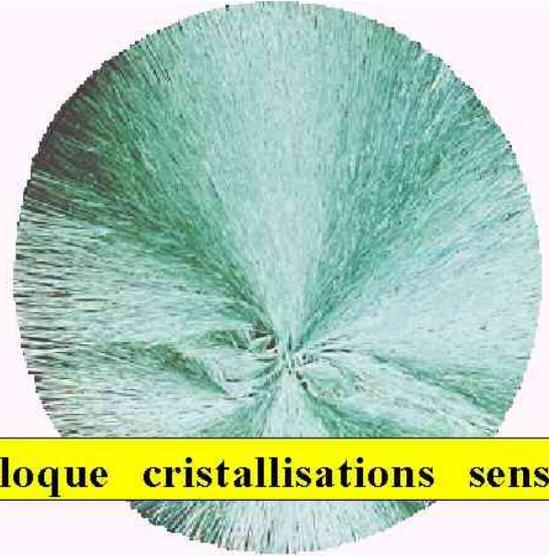
[Approche Agro-Alimentaire](#)

[Conclusion \(M. Cocude\)](#)



Secrétariat d'État à l'Industrie

**Commission des recherches scientifiques et techniques sur
la sécurité et la santé dans les industries extractives**



Colloque cristallisations sensibles

PRÉSENTATION GÉNÉRALE (Marcel COCUBE¹)



(1) M.Cocube Président de la CORSS (Commission des Recherches Scientifiques et Techniques sur la Sécurité et la Santé dans les Industries extractives).

La cristallisation de chlorure cuivrique en présence d'additif permet-elle le diagnostic précoce des maladies et l'évaluation de la qualité des aliments ?

Il est d'expérience courante que la cristallisation de solutions salines, la solidification de bains métalliques, les dépôts électrolytiques de sels métalliques sont très affectés dans leur forme comme dans leur consistance par la présence d'impuretés, fussent-elles en proportions infimes. Ainsi la cristallisation de solutions de CuCl_2 est-elle très sensible à la présence d'ajouts même en faibles quantités.

L'élimination des impuretés peut constituer un objectif majeur dans la mesure où elles affectent la qualité du produit final. A l'inverse leur présence, qui s'avère parfois difficile à tester et plus encore à mesurer, est susceptible d'être décelée au vu du résultat obtenu à la fin du processus de cristallisation.

La sensibilité particulière du chlorure cuivrique à la présence d'impuretés a été utilisée par la méthode des cristallisations "sensibles" pour mettre en évidence l'influence spécifique d'additifs de toutes natures sur la cristallisation.

Or on peut penser que **des extraits biologiques véhiculent des informations sur l'état de santé, humaine ou végétale, et que, en influençant la cristallisation, ils permettent au vu du résultat d'apprécier cet état de santé** et d'identifier une pathologie avérée ou latente.

Telle a été la démarche des fondateurs de la méthode des cristallisations sensibles avec Pfeiffer dans les années 30 en Suisse et en Allemagne. Depuis, des chercheurs, physiciens, biologistes, se sont appliqués à apprécier, voire codifier, les cristallisations de solutions de CuCl_2 en relation avec des additifs biologiques tels que des sucres végétaux ou du sang humain.

L'approche médicale :

Les auteurs de langue allemande ont montré des corrélations entre certaines pathologies et certains aspects des cristallisations allant jusqu'à établir une sémiologie cristallographique où les formes observées sont ainsi étiquetées forme hépatique, pulmonaire, etc.

La démarche a été reprise en France pour essayer de voir si la cristallisation pourrait permettre de

prévoir l'apparition à terme d'une pneumoconiose à un stade pré-clinique, détection d'autant plus importante pour déclencher des mesures de prévention que l'apparition de la maladie marque le début d'une évolution irréversible avec les thérapeutiques actuellement connues. Une expérimentation menée avec des mineurs de charbon a donné des résultats encourageants. D'autres expériences vont dans le même sens.

L'approche agro-alimentaire :

Elle vise à reconnaître la "qualité" d'un produit au sens de sa compatibilité biologique avec l'organisme humain qui l'ingérera. Mais cette démarche très ambitieuse - essentielle pour l'avenir - n'est pas la nôtre aujourd'hui. Plus modestement nous nous proposons d'examiner si la cristallisation peut être un indicateur de la "qualité" du produit au sens de son identification quant à son origine, aux traitements qu'il a subis pour sa transformation et son stockage, jusqu'à sa mise à la disposition du consommateur final.

Les expérimentations menées en divers lieux permettent de fonder ce qui au stade actuel n'est encore qu'une hypothèse.

* *

*

Les cristallisations sont d'abord restées confinées au monde germanophone où leur étude a pris naissance.

Puis, elles ont débordé ce cadre et gagné de nouvelles aires culturelles, en Europe même, au Japon et en d'autres Pays.

Le moment est venu de confronter les expériences et de voir si la cristallisation de CuCl_2 peut être :

- . dans le domaine médical l'indicateur d'un risque pour la santé.
- . dans le domaine agroalimentaire un référentiel permettant le classement des produits alimentaires sans erreur ou avec une probabilité minimale d'erreur.

Tel est l'objet du colloque organisé dans le cadre de la Commission des recherches scientifiques et techniques sur la sécurité et la santé dans les industries extractives.

N.D.R.L. Les différents articles résument, plus ou moins brièvement, les exposés présentés en séance.

I. DONNEES SCIENTIFIQUES

Du germe à l'arbre, croissance hors équilibre des structures arborescentes

Mécanisme physique de la croissance cristalline avec impuretés et structure cristalline du chlorure
cuivrique hydraté

Discussion générale

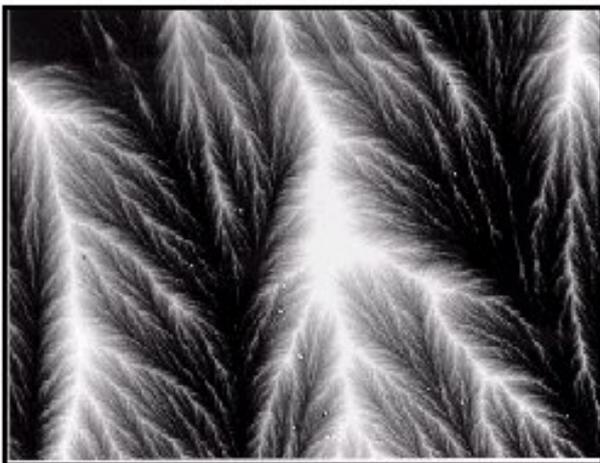
Du germe à l'arbre, croissance hors équilibre des structures arborescentes

(Vincent FLEURY)¹

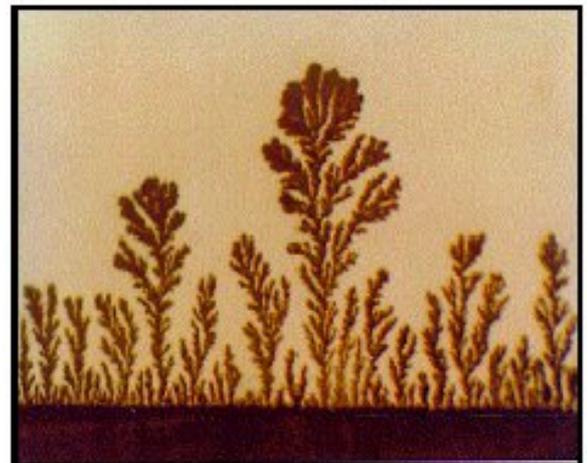
1) *Laboratoire de physique de la matière condensée. Ecole Polytechnique PARIS.*



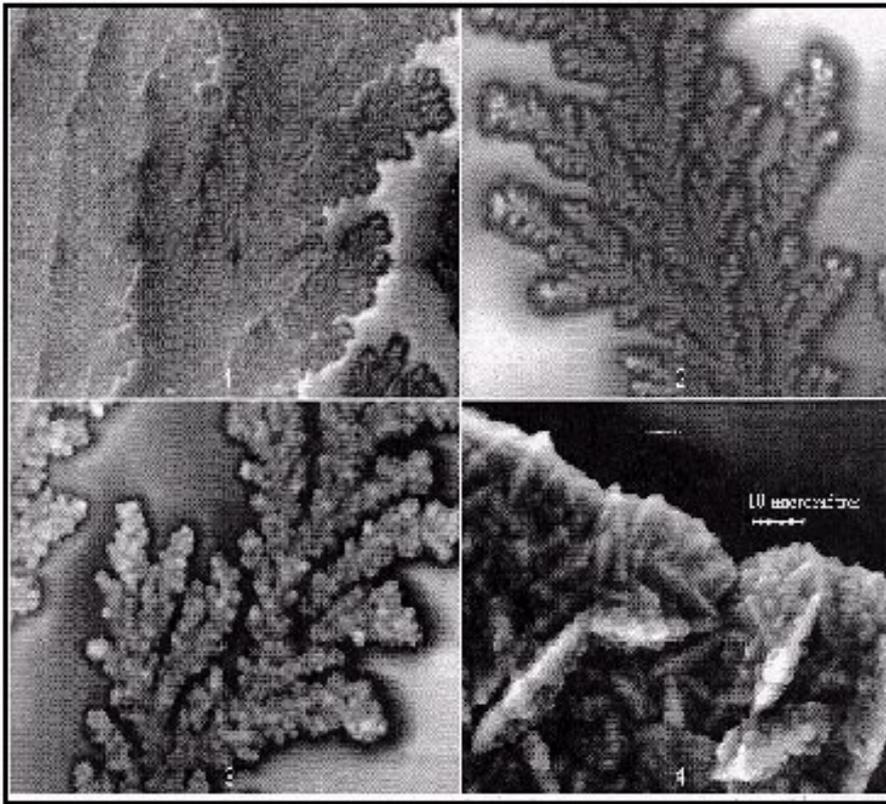
Il est bien connu que la croissance cristalline conduit, lorsque cette croissance est lente, à des formes macro-cristallines bien définies (quartz, grenat, etc.). Ces formes peuvent, dans certains cas, permettre l'identification des mailles cristallines sous-jacentes. Une information microscopique peut donc se transmettre, en cristallisation, à l'échelle macroscopique. Les croissances rapides, hors équilibre, aboutissent également à des formes particulières. Les plus connues sont : la dendrite, l'arborescence fractale, la forme sphérolitique. Dès lors qu'une croissance est hors équilibre, la notion de faciès cristallin perd son sens et l'on parle davantage de "texture". La texture représente la "géométrie" de cristallisation résultant de la croissance rapide de polycristaux qui peuvent présenter une organisation à grande échelle (arborescente par exemple)



Dépôt électrolytique de cuivre à très grande vitesse (environ 100 $\mu\text{m} / \text{s}$)

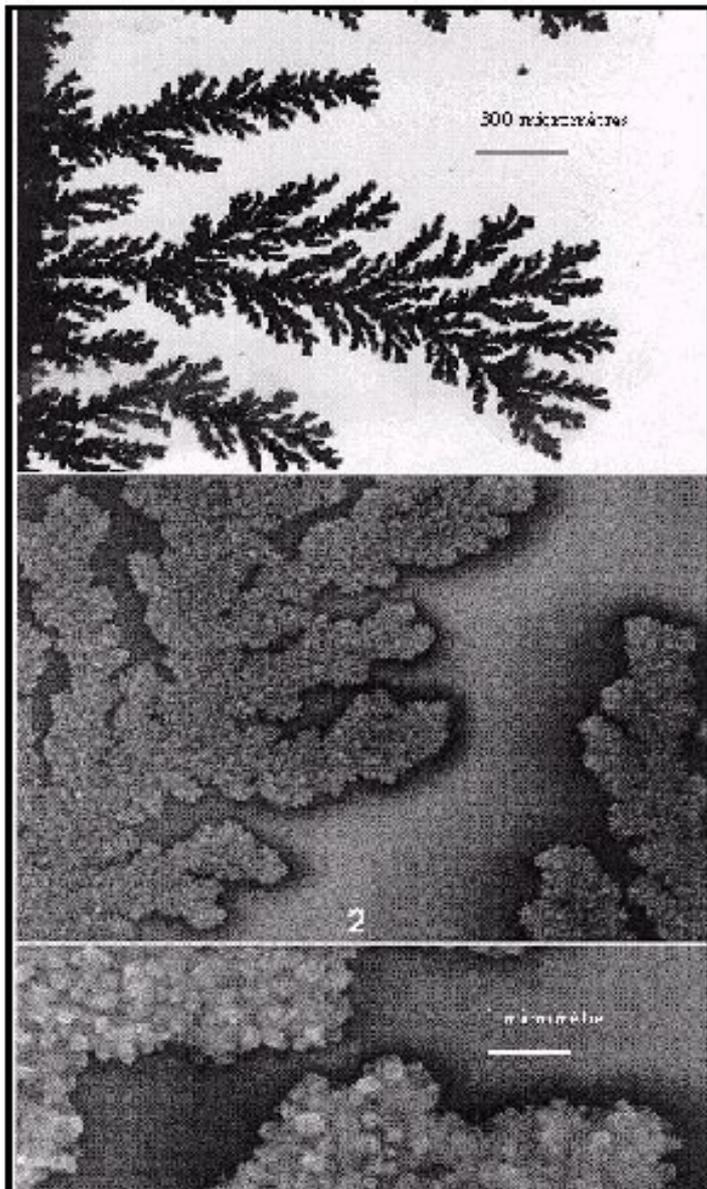


Dépôt électrochimique de cuivre



Texture fonction de la vitesse de croissance

Des travaux récents ont permis de mieux comprendre le couplage entre les phénomènes microscopiques, interfaciaux, et l'émergence d'une forme globale, macroscopique. On observe ainsi que des mécanismes très différents conduisent à des formes identiques. C'est le résultat de *l'universalité*, propriété statistique des phénomènes critiques. L'universalité stipule que, à grande échelle, certains détails du mécanisme de croissance deviennent indifférents. Ainsi, un arbre électrochimique ressemblera à une arborescence liquide ou à une colonie de bactéries. En ce sens, la croissance *n'est pas* sensible au détail du processus : on dit techniquement que certains paramètres sont *inessentiels*. A l'opposé, dans des conditions somme toute très proches de croissance, on peut obtenir des formes très différentes, car on a agi sur un paramètre *essentiel*. Dans ce cas, la forme à grande échelle est modifiée, et l'on assiste à un véritable phénomène de "révélation", dans le macroscopique, d'un élément microscopique du processus.



Nous présenterons un panorama de ces phénomènes de cristallisation très éloignés de l'équilibre, qui conduisent à la formation rapide de structures complexes macroscopiques. Nous mettrons l'accent sur le couplage entre les mécanismes de nucléation et les mécanismes de transport hors équilibre, aboutissant à des formes dont la morphologie globale hérite de certains détails du mécanisme microscopique, moléculaire, d'où la possibilité, en principe, d'utiliser ces mécanismes comme révélateurs de la présence d'additifs ou de molécules d'intérêt biologique.



Agrandissements successifs

Mécanisme physique de la croissance cristalline avec impuretés et structure cristalline du chlorure cuivrique hydraté (Takashi SHIBATA)



Par Takashi SHIBATA¹⁾,

Sumiko MATSUMOTO¹⁾,

Kei FURIYA²⁾,

Teiko NAGANO¹⁾ et

Tomoya OGAWA³⁾

1) Department of Anatomy, Tokyo Women's Medical University

2) Tokyo Womens' Medical University

3) Department of Physics, Gakushūin University

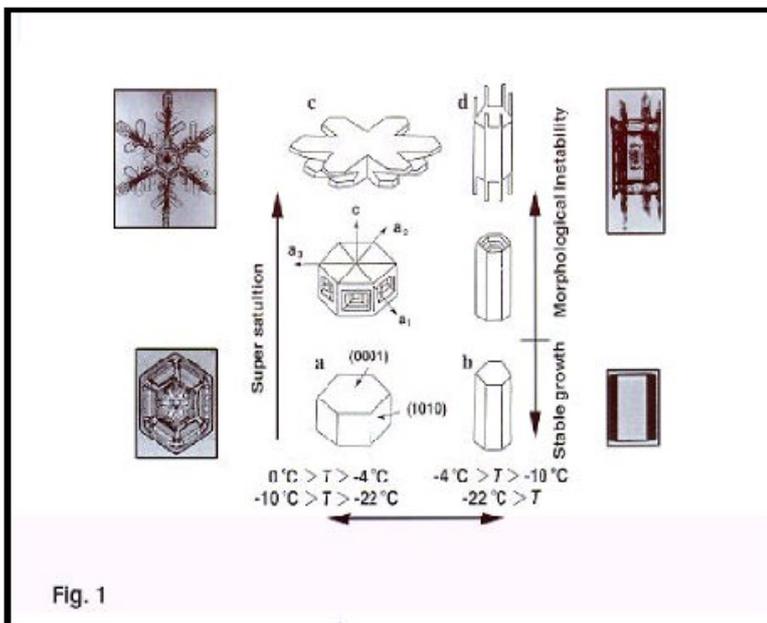


Fig. 1

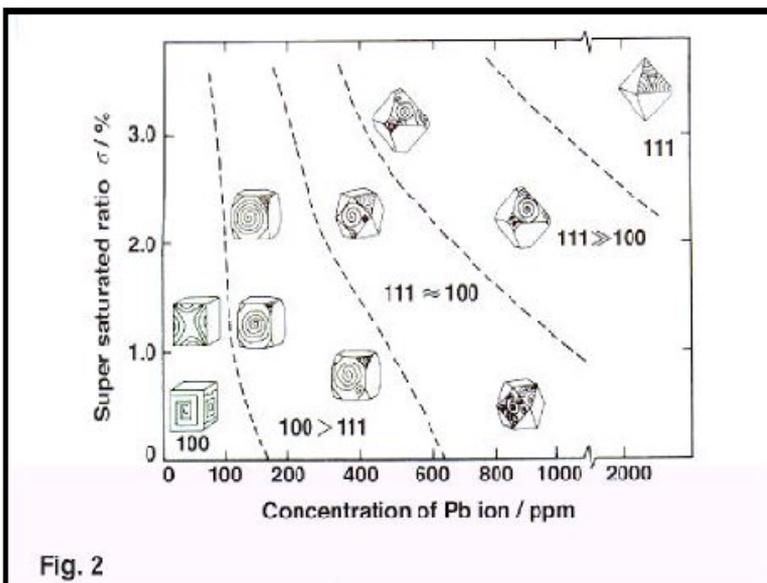
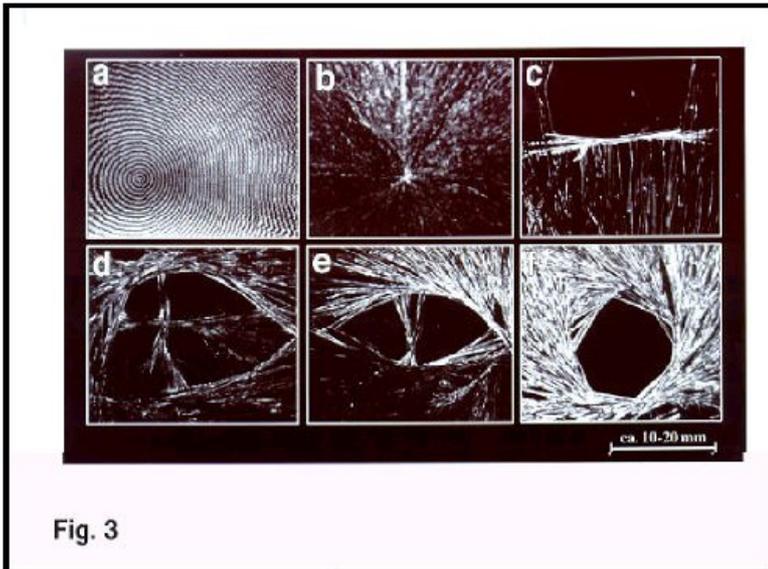


Fig. 2

Introduction

La croissance des cristaux est très sensible aux conditions ambiantes, comme la température, le degré de sursaturation et les impuretés qui modifient la forme des cristaux. La grande diversité des formes de cristaux de neige ne comporte que quatre types différents, plaquettes, prisme, dendrites et aiguilles, en fonction de la température et de la pression de vapeur sursaturée, comme le montre la **fig. 1** [1]. D'autre part, l'effet des impuretés ou des additifs a fait l'objet de nombreuses recherches. En 1783, Romé de Lisle a observé un changement morphologique du cube à l'octaèdre dans du NaCl obtenu à partir d'une solution contenant de l'urée [2]. Kern a étudié le changement de comportement du KCl de solutions aqueuses en fonction des degrés de sursaturation et de la concentration de l'ion Pb en tant qu'impureté et il a établi le diagramme d'équilibre de la morphologie des cristaux de KCl, appelé morphodrome, représenté par la

fig. 2 [3]. Il est connu que l'examen microscopique de lames de couches minces séchées de mucus cervical (sécrété par l'utérus) a révélé des changements morphologiques des cristaux en fonction du cycle menstruel. Les cristaux sont du NaCl dans le mucus cervical et la croissance dendritique de ce NaCl est provoquée par les œstrogènes et inhibée par la progestérone.



De plus, les variations des formes de croissance des cristaux dendritiques de chlorure cuivrique selon la maladie d'un patient dont le sang a été additionné en faible quantité aux solutions aqueuses sont connues depuis longtemps, elles ont été rapportées pour la première fois par Pfeiffer [4]. Selawry et Selawry ont étudié la morphologie détaillée spécifique durant la croissance, comme le montre la **fig. 3** [5]. Nickel a rapporté également une cristallisation dendritique spécifique [3] et Cocude et coll. ont récemment étudié la silicose [7]. Koopmans a discuté le cas de tumeurs malignes [8] et Barth a rapporté qu'une forme spécifique due aux tumeurs pouvait être détectée bien avant qu'il soit possible de procéder au diagnostic par les méthodes classiques [9].

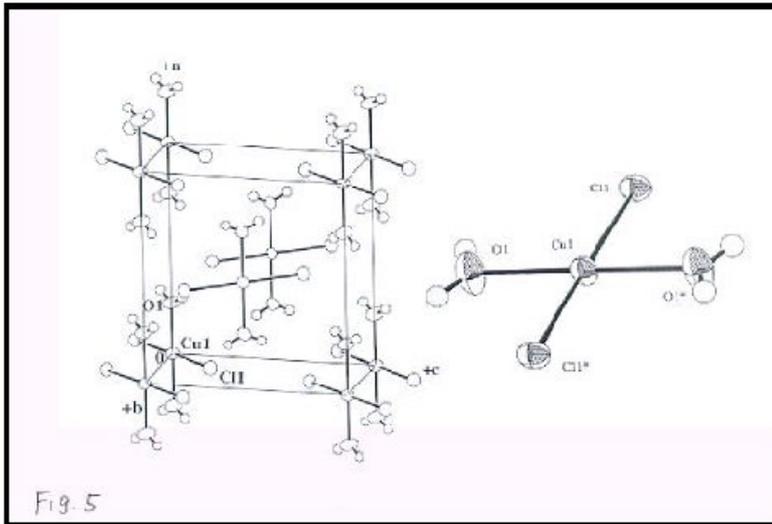
Piva et coll. ont précisé que certains types de cristallisation étaient corrélés aux variations de différentes protéines sériques [10]. Ballivet et coll. ont montré aussi depuis longtemps déjà que non seulement le sang humain, mais également les extraits végétaux influencent la croissance dendritique des cristaux.

Les changements de configuration des cristaux de chlorure cuivrique hydraté obtenus avec du sang humain ou des extraits végétaux ont fait l'objet de nombreuses études. Cependant, peu d'études ont été menées pour analyser le mécanisme de la croissance anormale de cristaux. C'est pourquoi nous l'avons étudiée d'un point de vue physico-chimique.

Théorie générale de la croissance cristalline

Les mécanismes de la croissance sont divisés en trois catégories selon la nature des surfaces. Une catégorie est appelée croissance "à interface rugueuse", qui est formée de manière homogène par les

Les comportements thermiques sont assez différents entre solution pure et additionnée de sang, comme le montre l'analyse thermique différentielle (DTA) [13]. Ces résultats nous permettent de conclure que les cristaux verts obtenus à partir de solutions pures sont instables et se transforment en cristaux bleus stables en peu de temps, alors que les cristaux verts obtenus après addition de sang sont plutôt stables et conservent plus longtemps leur couleur verte.



Analyse de la structure des cristaux

Les cristaux bleus et verts ont la même structure cristalline, indépendamment de la présence ou de l'absence de sang. La **fig. 5** [14] représente le dessin ORTEP d'un motif de base et d'une molécule, déterminé par diffraction de rayons X, d'un cristal bleu obtenu à partir d'une solution pure.

Une paire d'atomes de chlore se fixe sur un atome de cuivre et une paire d'atomes d'oxygène provenant de 2 molécules d'eau se coordonne au cuivre dans le sens perpendiculaire dans le même plan. Le cristal vert a la même structure.

Les résultats suggèrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les cristaux bleus et verts et que ces deux types de cristaux sont bihydratés. Le calcul du diamètre de van der Waals suggère qu'il n'y a pas d'espace pour des molécules d'eau résiduelles dans le réseau qui a été déterminé. Les contradictions entre les résultats nous amènent à conclure que l'eau résiduelle (c'est-à-dire un degré d'hydratation supérieur à 2) se trouve dans un état amorphe désordonné qui rend impossible la détection par la méthode de diffraction de rayons X.

Structure cristalline désordonnée par calorimétrie à balayage différentiel (DSC)

Puisque des différences nettes entre les dendrites bleues et vertes de chlorure cuivrique hydraté sont démontrées par la mesure par calorimétrie à balayage différentiel, effectuée entre -140°C et 40°C [14] - bien que quelques différences de structure entre les cristaux aient été montrées par la goniométrie dans quatre directions pratiquée par la méthode de diffraction de rayons X sur un cristal isolé - les observations qui précèdent suggèrent que l'eau résiduelle d'un cristal vert, contrairement à la dihydratation d'un cristal bleu, résulte une structure cristalline désordonnée. Bien que les dendrites vertes obtenues à partir de solutions aqueuses pures aient une courte durée de vie, celles obtenues à partir d'une solution contenant une faible quantité de sang humain ont conservé un état méta-stable. Bien que le comportement thermique des dendrites vertes instables mesuré par calorimétrie à balayage différentiel (DSC) soit différent de celui des dendrites vertes relativement stables, il semble que leur structure cristalline présente peu de différence.

Structure des solutions

La structure de nombreux types de solutions fait depuis peu l'objet d'études par diffraction de neutrons, XAFS, et par d'autres méthodes. Les résultats montrent que Cu^{2+} et Cl^{-} sont hexahydratés par les molécules d'eau dans les solutions diluées [15]. La couleur bleu ciel de la solution de chlorure cuivrique doit être due aux ions Cu^{2+} hydratés. Dans les solutions concentrées, c'est-à-dire sursaturées, deux molécules d'eau se coordonnent à Cu^{2+} dans les directions supérieures et

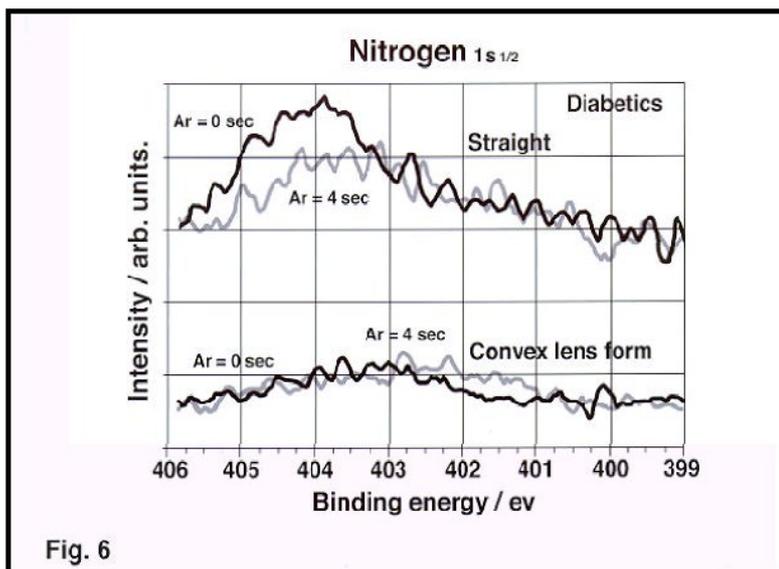
inférieures de l'octaèdre [15]. Dans le plan interne de l'octaèdre contenant du Cu^{2+} , deux ions Cl^- et deux molécules d'eau se coordonnent à Cu^{2+} . Ces distances sont presque similaires aux valeurs que nous avons déterminées pour le monocristal de chlorure cuivrique hydraté. Dans l'état cristallin, deux molécules d'eau sont reliées à des molécules de Cu liées. La raison de la couleur verte de la solution concentrée semble être due à un changement dans la densité des électrons en raison de la coordination de deux molécules d'eau dans le sens axial de l'octaèdre.

Nous supposons que cette hydratation supplémentaire est l'une des raisons pour lesquelles le chlorure cuivrique est sensible à l'addition de sang.

Analyse de distribution des additifs par spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS)

Afin de comprendre l'effet de l'addition de sang sur la morphologie des dendrites de chlorure cuivrique, l'état énergétique des électrons du cuivre, du chlore, du carbone, de l'oxygène et de l'azote a été étudié par spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS). Comme nous l'avons indiqué précédemment, des changements chimiques anormaux de l'état énergétique ont été observés avec succès pour les atomes de cuivre et d'azote par absorption d'atomes d'azote provenant des protéines ou des acides aminés du sang [13].

Au cours de cette étude, afin de déterminer si l'azote provenant du sang est contenu à l'intérieur des cristaux ou est seulement adsorbé à leur surface, nous avons procédé à des mesures par spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS) en attaquant les cristaux par des projections d'ions Ar accélérés, afin d'obtenir des profils de concentration (en profondeur).



Nous n'avons pas du tout détecté d'azote ni à la surface ni à l'intérieur des cristaux de chlorure cuivrique pur. La concentration relative d'azote était plus élevée à la surface et une différence chimique entre cristaux normaux et cristaux obtenus à partir d'une solution contenant du sang d'un patient diabétique, a été détectée comme le montre la **fig. 6**.

D'après cette observation, il existe entre les cristaux une différence dans le mécanisme d'adsorption à la surface. L'azote des protéines et/ou des acides aminés du sang se fixe sur Cu à la surface des cristaux de chlorure cuivrique hydraté. Les composants sanguins étaient en dessous des limites de détection à l'intérieur du cristal. Une analyse détaillée est en cours.

Les résultats qui précèdent montrent que le sang a un effet considérable sur la croissance des cristaux de chlorure cuivrique hydraté.

Bibliographie:

- [1] Furukawa Y. : Morphology of snow and ice, Handbook of Crystal Growth (The Japanese Association for Crystal Growth ed.) p. 226-228, Kyouritsu, Tokyo (1995)
- [2] Romé de Lisle JB. : Cristallographie, 2ème éd., 1, 379, 1739.

- [3] Snawaga I. : Morphology of polyhedral crystal, Handbook of Crystal Growth (The Japanese Association for Crystal Growth ed.) p. 210-215, Kyouritsu, Tokyo (1995)
- [4] Pfeiffer E. : Kristalle. Orient-Occident Verlag, Stuttgart (1930)
- [5] Selawry A. und Selawry O. : Die Kupferchlorid-Kristallisation in Naturwissenschaft und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1957)
- [6] Nickel E. : Die Reproduzierbarkeit der Sogenannten Empfindlichen Kupferchloridkristallisation. Bull Soc frib Sci Nat 57 : 65-179, 1967-68
- [7] Cocude M., Barth JG., Bruyet B. François P.: La pneumoconiose des houilleurs et son suivi médical. La méthode des cristallisations sensibles au banc d'essai. Industrie Minérale Décembre : 41-47, 1992.
- [8] Koopmans A. : Pfeiffersche Blutkristallisation und Malignom-Bereitschaft. Elemente der Naturwissenschaft 52 : 28-35, 1990.
- [9] Barth JG. : Empfindliche Kristallisation. Krebs und Präkanzerose. Elemente der Naturwissenschaft 52 : 42-50, 1990
- [10] Piva MT., Lumbroso S., Sieso V. et al : Cupric chloride crystallization with human blood study of pictures obtained in different pathologies. Elemente der Naturwissenschaft 61 : 25-39, 1994
- [11] Sunagawa I. : Morphology and crystal growth conditions, Handbook of Crystal Growth (The Japanese Association for Crystal Growth ed.) p. 202-204, Kyouritsu, Tokyo (1995)
- [12] Shibata T, Takakuwa Y., Tanaka A. et al : Doping effect of human blood on surface microstructure of cupric chloride dendrites grown from aqueous solutions. J Crystal Growth 167 : 716-718, 1996
- [13] Shibata T, Shirasaka R., Ogawa T. et al :Effect of human blood addition on dendritic growth of cupric chloride crystals in aqueous solutions. J Crystal Growth 142 : 147-155, 1994
- [14] Shibata T, Takakuwa Y., Tanaka A. et al : Crystal structure of blue and green hydrated cupric chloride grown from aqueous solutions with and without human blood addition : single crystal X-ray diffraction analysis and differential scanning calorimetry (DSC). J. Tokyo Wom Med Univ 6-7 : 358-369, 1998
- [15] Ohtaki H., Izumi K. : Structure of solutions, Handbook of Crystal Growth (The Japanese Association for Crystal Growth ed.) p. 89-93, Kyouritsu, Tokyo (1995)

Q V.SIESO

Les phénomènes présentés sont-ils réversibles ou irréversibles ? Quelle est l'influence du temps ? On a parlé de cristallisation minérale, qu'en est-il du vivant, les coquilles, les os par exemple ?

R V.FLEURY

Il n'y a que le temps qui influe, et le mécanisme est irréversible. Des amas de (n) atomes, auxquels on rajoute un autre atome, deviennent des amas de (n+1) atomes et ainsi de suite.

Le mécanisme de nucléation est hétérogène

Quant aux coquillages, les phases de cristallisation sont différentes. Le mode de croissance est différent à cause de la bave. On a un arrangement de cristaux différent qui donne des carapaces très solides.

Q V.SIESO

Que penser d'autres paramètres, la température, la gravité, sachant que des expérimentations de cristallisation ont lieu dans l'espace.

R V.FLEURY

La gravité n'a aucun rôle. Comme la densité des constituants est différente, on observe des gradients de densité dans le liquide. Il y a donc des phénomènes de convection. L'effet global est que la gravité amène une augmentation du flux. Dans les expériences en apesanteur (dans la navette) la convection est éliminée, la solution est plus tranquille et on obtient de gros cristaux, pas des dendrites.

La température est un des grands paramètres à contrôler ; tout dépend de la température et ce de façon exponentielle.

Q Mme BALLIVET

Je me réfère à l'article de M. FLEURY^[1] et souhaite revenir aux photographies portant sur les arbres et les grains. Après chaque événement de nucléation, il y a comme une sorte de retour à des conditions initiales qui rendent possible une nouvelle nucléation.

R V.FLEURY

Le cristal peut être cristal jusqu'à l'échelle atomique, l'objet fractal n'est pas fractal jusqu'à l'échelle atomique. Il y a deux échelles, sur l'une on voit un arbre, sur l'autre de petites boules. Un grain représente des milliards d'atomes, une branche correspond à un chapelet de grains les uns derrière les autres. Ce qui compte, c'est la fréquence de nucléation. Un grain pousse, puis le suivant. Cela peut être simulé numériquement. Lorsqu'un grain croît, c'est une entité tridimensionnelle ; plus il croît, plus la vitesse diminue. Pendant ce temps, l'inhibiteur peut diffuser puis apparaît un nouveau grain. L'inhibiteur influe sur la croissance, donc sur la taille des grains.

Q M. COCUDE

Cette question s'adresse à M SHIBATA. C'est à propos des cristaux et de l'hydratation des cristaux. On parle souvent de chlorure cuivrique, sans plus, mais le degré d'hydratation est important. Or, dans sa présentation, il parle aussi de coloration de cristaux, bleus ou verts. Y a-t-il une concordance entre les deux ? Est-ce que la coloration bleue ou verte est liée à un certain degré d'hydratation ?

Avec la présentation des cristallisations de sang de diabétique, on arrive aux applications médicales qui sont au programme de cet après-midi.

Est-ce que dans l'analyse du sang des diabétiques, on arrive à des écarts significatifs par rapport à un sang normal. Mais qu'est-ce qu'un sang normal (ici, un sang témoin) ?

R T. SHIBATA

Pour la coloration de la cristallisation, j'ai utilisé la méthode thermique que l'on appelle TG-DTA^[2] qui a montré que la cristallisation bleue comporte 2 H₂O (CuCl₂ · 2H₂O) et la cristallisation verte 2,5 H₂O ((CuCl₂)₂ · 5 H₂O). Je fais l'hypothèse que la couleur vient de la quantité d'eau, ceci est confirmé par d'autres expériences. J'ai utilisé la diffraction de rayons X (X-Ray) qui n'a montré aucune différence mais en utilisant la technique DSC (Differential scanning calorimetry) on a trouvé une différence et à -70°C, je suis sûr qu'il y aura une différence. La cristallisation verte est une forme instable. Quand 1/2 H₂O part, il reste une couleur bleue, mais quand on ajoute du sang la couleur verte demeure.

L'hydratation est un élément instable qui permet - et c'est mon hypothèse - de distinguer le sang témoin du sang diabétique. Pour moi le sang de diabétique donnerait une cristallisation de CuCl₂ à 2,6 H₂O alors que le sang normal serait à 2,5 H₂O.

A la surface des cristaux on peut détecter de l'azote provenant des acides aminés et des protéines. L'utilisation de la technique XPS (X-Ray photo-electro spectroscopy) montre que ces éléments sont absorbés à la surface des cristaux (Echange d'électrons périphériques avec le chlorure cuivrique) mais ne sont pas détectables à l'intérieur des cristaux. Ces éléments, non seulement N, mais aussi C, O, influencent la morphologie de la cristallisation.

Complément de réponse V. FLEURY

Je comprends que, lorsque vous cristallisez du chlorure de cuivre en présence de sang, les éléments du sang ne se retrouvent pas en inclusion dans le chlorure de cuivre, mais seulement à la surface. Si cela est exact, c'est extrêmement important pour la cristallogénèse. Si on met des éléments étrangers dans un cristal, on change le mode de croissance et beaucoup de choses.

Complément M. COCUDE

Cette propriété permettrait peut-être de voir quels sont, dans le sang mis à cristalliser, les éléments pertinents en ce qui concerne le diagnostic (ceux qui ont une signification du point de vue étiquetage ou codage de la pathologie). Il serait intéressant de creuser cette propriété.

Suite réponse T. SHIBATA

Pour la définition du sang de référence (normal), c'est une question sensible.

Dans l'expérience avec les diabétiques j'ai adopté 3 critères pour la définition du sang de référence:

L'un subjectif en interrogeant les sujets : ils se “ sentent bien”,

L'autre, objectif, avec l'analyse sanguine : analyse initiale avec prise de sang (pas de résultats anormaux, sucre...).

Le troisième, absence de diabète.

Pour ce qui concerne ma recherche, j'ai utilisé du sang de personnes diabétiques qui sont hospitalisées, mais qui n'ont pas encore été traitées. On en parlera davantage cet après-midi.

[1] Référence à l'article de M. FLEURY paru dans la revue NATURE vol 390 13 Nov 97 (p 145-148) : “Branched fractal patterns in non-equilibrium electro-chemical deposition from oscillatory nucleation and growth”.

[2] TG-DTA Thermo-gravimetry differential thermal analysis.

II. MATERIELS ET METHODES UTILISES

[Les aspects techniques de bio-cristallisation \(J-O. Andersen\)](#)

[Lecture des images et analyse visuelle \(J-G. Barth\)](#)

[Traitement et analyse par vision artificielle \(G. Teisseron & R. Neumann\)](#)

[Influence de champs électriques et magnétiques \(D. Charpentier\)](#)

[Discussion générale](#)

II ² MATÉRIELS ET MÉTHODES UTILISÉS



De gauche à droite : J-O. ANDERSEN , J-G. BARTH, G. TEISSERON, R. NEUMANN, D. CHARPENTIER.

Les aspects technologiques de la bio-cristallisation (Jens-Otto ANDERSEN)

Jens-Otto ANDERSEN¹ et Jens LAURSEN²

¹) Department of Agricultural Sciences

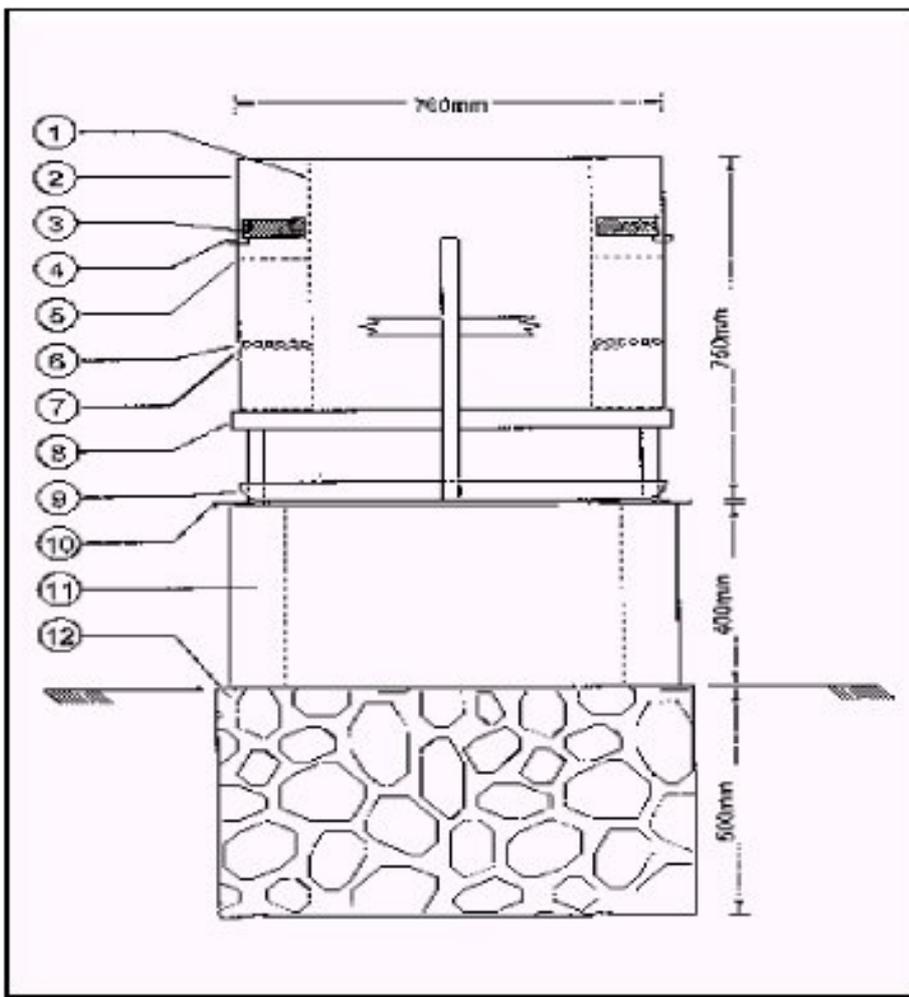
²) Department of Mathematics and Physics

The Royal Veterinary and Agricultural University,
Danemark



La biocristallisation, appelée aussi "cristallisation sensible" ou "cristallisation du chlorure cuivrique", a été initialement présentée par E. Pfeiffer dans les années trente. De nos jours, cette méthode est essentiellement appliquée en recherche médicale et agricole. Elle se fonde sur le phénomène cristallographique selon lequel l'addition de substances ioniques inorganiques spécifiques et, d'une manière générale, de toutes substances organiques à une solution aqueuse de CuCl_2 dihydraté produit en cours de cristallisation des cristallogrammes offrant des textures dendritiques reproductibles.

La reproductibilité d'un processus de cristallisation présuppose le contrôle de facteurs physiques tels que la température de l'air, l'hygrométrie, l'égalisation du support de cristallisation, les vibrations et les particules. Des installations de cristallisation d'une grande diversité ont été conçues pour répondre à ces exigences, depuis les petits réacteurs jusqu'aux vastes enceintes de cristallisation au sein desquelles il faut pénétrer pour préparer une expérience. Le manque de techniques de cristallisation bien établies et documentées constitue, peut-on affirmer, un puissant frein à une plus large diffusion de la méthode.



Vertical cross-section of crystallization apparatus.

1) Inner cylindric pipe. 2) Outer cylindric pipe. 3) Plane ground steel double ring with 18 interconnecting struts. 4) Exentric. 5) Upper perforated steel plate ring for air temperature homogenization purposes. 6) Constantane heating thread. 7) Lower perforated steel plate ring. 8) Steel frame construction. 9) Water bowl. 10) Foundation steel plate. 11) Concrete foundation. 12) Concrete grund block. [From Andersen et al.(1998). A refined biocrystallization method applied in a pictomorphological investigation of a polymer. Elemente der Naturwissenschaft N° 68.]

Les résultats communiqués sont tirés d'une étude en cours relative au développement de techniques de cristallisation perfectionnées, qui font intervenir le contrôle d'un ensemble de facteurs influençant le déroulement et la durée des phases d'évaporation et de cristallisation.

Une méthode axée sur la combinaison d'une enceinte externe avec une enceinte interne ortho-octogonale équipée d'un appareil de cristallisation cylindrique est présentée. L'enceinte externe sert à maintenir une atmosphère contrôlée autour de l'enceinte interne, dont elle reçoit la chaleur et l'humidité que cette dernière lui cède par voie de diffusion à travers la structure en bois. L'enceinte interne offre un volume d'environ 9 m³.

Les résultats d'une étude de reproductibilité de la méthode sont présentés. Ils sont fondés sur la mesure des variations de la température de l'air et de l'humidité au cours de trois expériences similaires associées à des profils de variation de température et d'hygrométrie organisés en sessions expérimentales de 17 heures.

La conclusion qu'on en tire est que la méthode présentée apporte un perfectionnement notoire aux techniques de cristallisation, comparativement à une étude préalable réalisée sur la base d'une chambre cubique d'un volume d'environ 5 m³.

L'amélioration est attribuée à un ensemble de facteurs, dont les principaux sont:

1) les appareils engendrant une convection d'air (humidificateur, déshumidificateur, filtre à air) sont situés dans l'enceinte externe;

2) la combinaison d'une enceinte interne ortho-octogonale équipée d'un appareil cylindrique dans lequel les plaques de cristallisation sont disposées en cercle en regard d'éléments chauffants circulaires sous-jacents réduit notablement toute convection d'air forcée au-dessus des plaques;

3) un anneau en verre de 35 mm entourant la zone de cristallisation s'est révélé réduire les perturbations des gradients de concentration et des microconvections au sein de la solution de cristallisation en cours d'évaporation et au-dessus d'elle.

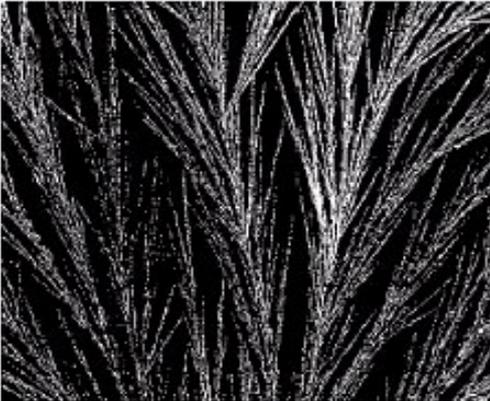
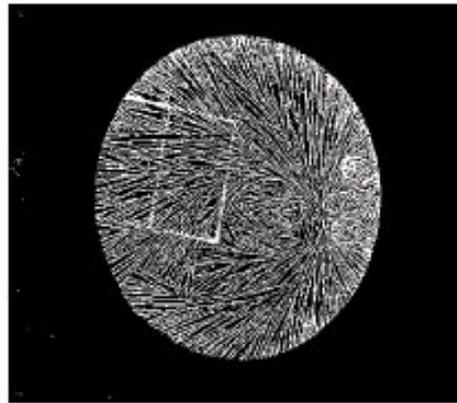
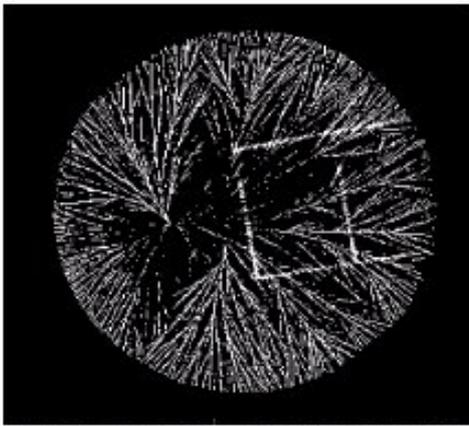
Bibliographie

Andersen et al. (1998): A refined biocrystallization method applied in a pictomorphological investigation of a polymer. *Elemente der Naturwissenschaft*, n°68 (à paraître).

1) Laboratoire de Biochimie-Coagulation Centre hospitalier André Bouloche, 2 rue du Docteur Flamand 25209 MONTBELIARD



Il s'agit d'étudier l'image définitive résultant du processus de cristallisation (exploitation statique). La méthode d'analyse recherche des propriétés générales et particulières caractéristiques, permettant des jugements comparatifs avec des images d'additifs de même nature voire de nature différente. La lecture visuelle demande un apprentissage et l'accumulation d'un grand nombre de données permettant des comparaisons discriminantes ou des orientations diagnostiques pertinentes. Le processus de lecture réduit la cristallisation à un objet bidimensionnel.



Images de cristallisation obtenues en présence de Lait : à gauche lait cru, à droite lait pasteurisé et homogénéisé UHT.

(Extrait de KNIJPENGA H. (1980))

Avec un même additif il est nécessaire d'étudier une série d'images obtenues dans les mêmes conditions expérimentales, principalement pour les raisons suivantes: les images d'une série ne sont pas identiques mais homologues, car la cristallisation est un système instable de croissance hors équilibre ; l'apparition de propriétés caractéristiques est influencée par la concentration de l'additif et il est par conséquent utile d'analyser des images obtenues avec des concentrations différentes de l'additif ; cette pratique se justifie également par le fait que les conditions opératoires sont encore insuffisamment maîtrisées.

Des additifs de nature différente donnent des images immédiatement discernables, globalement, sans analyse détaillée. Mais le plus souvent il n'en est pas ainsi car on cherche à distinguer des images obtenues avec des additifs de même nature.

PROPRIETES GENERALES DE L'IMAGE : on note l'importance relative des régions centrale, marginale et intermédiaire ; l'image peut être orientée ce qui permet de reconnaître des régions latérales , inférieure, supérieure et médiane (cf. sang humain).On identifie la structure cristalline:elle est constituée par les dendrites se dirigeant du centre vers la périphérie (mouvement centrifuge) et représente une véritable trame de l'image;enfin on évalue le degré de coordination de l'image c'est à dire l'incorporation des éléments particuliers de l'image dans la structure.

PROPRIETES PARTICULIERES DE L'IMAGE : on décrit la texture : elle est constituée de ramifications courtes plus ou moins denses qui prennent naissance sur les éléments de structure et ont tendance à remplir les espaces libres entre eux. On note l'existence de vacuoles (fréquentes avec les additifs de nature protéique) ainsi que leur localisation;enfin on décrit de nombreuses formations cristallines de petite dimension éparses (par exemple, formations stellaires ou transverses avec du sang humain),

L'ensemble des propriétés générales et particulières conduit à décrire des types d'images et constituent la base d'une sémiologie cristallographique utilisable dans les applications agro-alimentaires et médicales.Ces notions sont illustrées par les exemples suivants a)image de type protéine ou de type amidon;b) évolution de la texture pendant la conservation d'une plante alimentaire(selon M. ENGQUIST);c) texture des images du lait en fonction des traitements de conservation (selon H.KNIJPENGA) ; d) aspect général avec du sang humain.

PRECAUTIONS ET CRITIQUES:Les conditions opératoires peuvent influencer l'importance relative des zones centrale, périphérique et marginale (J. LERAY) surtout lorsque la quantité initiale de soluté est faible. La distinction entre structure et texture est didactique ; elle est éventuellement contestable du fait que la cristallisation peut être réduite à un objet fractal.

SELAWRY A et O. (1957):Die Kupferchlorid-Kristallisation. Gustav Fischer Verlag Stuttgart

LERAY J.(1973):Profil de la surface libre d'un film liquide hétérogène. Journal de chimie physique, N°10.p. 1428-1432

KNIJPENGA H. (1980):Bildschaffende Methoden .1n:BOCKEMUHL J.:Lebenszusammenhänge erkennen,erleben,gestalten. Naturwissenschaftliche Sektion der freien Hochschule fer Geisteswissenschaft am Goetheanum, Dornach p.58-60

ENGQUIST M. (1989):Qualitätsprüfung an Gcmüse durch die Kupferchlorid-Kristallisationsmethode. Forschungsring für biologischdynamische Wirtschaftsweise Darmstadt.

Caractérisation statique et classification des images (Georges TEISSERON ¹ & Richard NEUMANN ¹)



G. TEISSERON

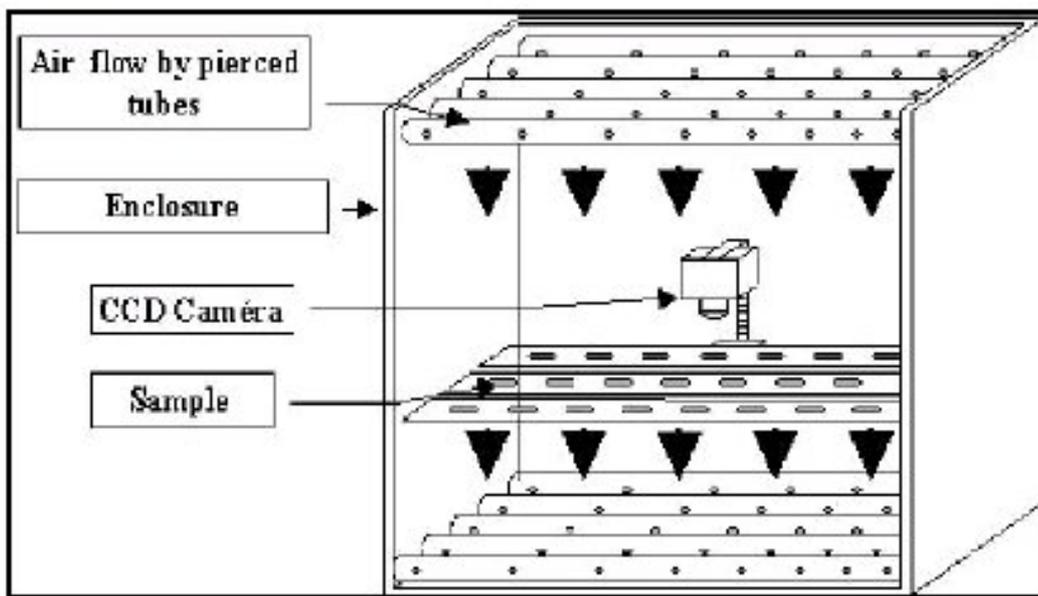
¹ Université Joseph Fourier, Laboratoire d'instrumentation micro-informatique et électronique. GRENOBLE.

Grâce au développement des moyens de calcul, de traitement et d'analyse, l'étude des images de cristallisations sensibles à des additifs biologiques ou chimiques peut être effectuée de manière automatique.

L'imagerie constitue un révélateur de choix permettant l'analyse de ces croissances cristallines dont la grande complexité fournit une multitude d'informations provenant de la texture, de la structure et des formes caractéristiques qui composent chaque image. Un traitement adapté des images permet ainsi l'extraction de paramètres issus de ce développement cristallin grâce à l'analyse des relations qui existent entre chaque région dans le temps et l'espace. Nous avons choisi de caractériser la croissance dans son ensemble, c'est pourquoi la quasi-totalité de l'image est analysée (70%).

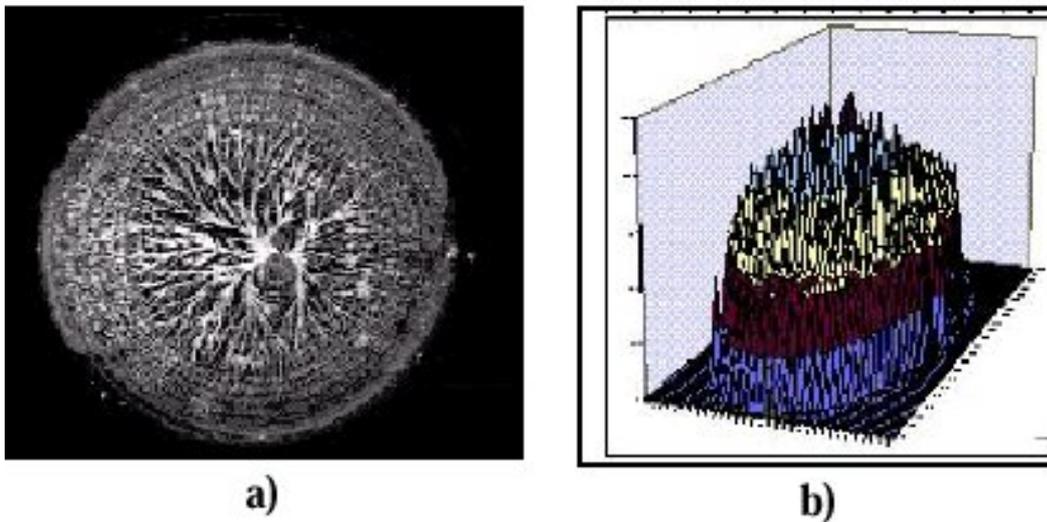
Afin de maîtriser la réalisation des croissances de chlorure cuivrique (CuCl_2), $2\text{H}_2\text{O}$) avec additifs, le laboratoire s'est doté fin 1994 d'une enceinte climatique de type «Pagot», d'un volume de $3,6 \text{ m}^3$, réalisée en bois avec double caisson isolé sur les parois externes, d'un poids d'environ 500kg, et montée sur suspensions pneumatiques afin de l'isoler des vibrations du bâtiment.

Cette enceinte a été modifiée afin de pouvoir être réglée en température ($29^\circ\text{C} \pm 0,8^\circ\text{C}$) et hygrométrie ($56\% \pm 1\%$). Dans sa configuration actuelle, l'enceinte peut permettre la cristallisation simultanée de 44 plaques de CuCl_2 avec additifs. Un tel nombre de plaques peut permettre la comparaison de deux séries de croissance



cristalline avec additifs différents qui ont cristallisé en même temps. La disposition des plaques dans l'enceinte permet d'avoir, en moyenne, les mêmes conditions de croissance pour les deux séries.

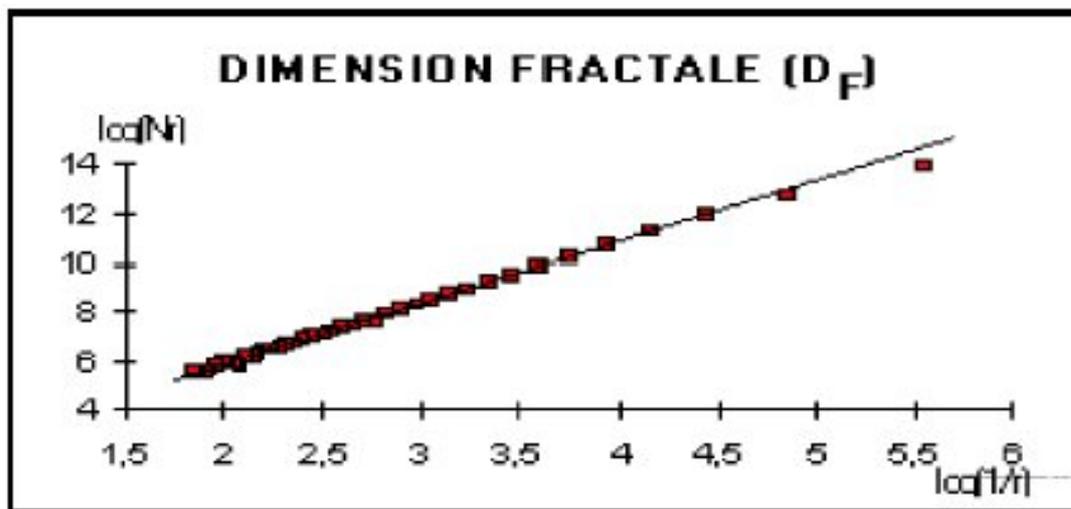
FIGURE 1 : Crystallisation enclosure



a)

b)

Au cours d'une première thèse menée au LIME (Laboratoire d'Instrumentation de Micro-Informatique et Electronique), un logiciel permettant la classification de produits de natures différentes (par l'espèce, le vieillissement) a été élaboré à partir des images produites en fin de cristallisation. Afin d'extraire les paramètres utiles à la classification, la texture des images



c)

$$D_f = \frac{\log(N_i)}{\log(1/r)} = 2,406485$$

FIGURE 2 : a) Initial image. b) 3D representation of the image. c) Fractal dimension of its surface.

Analysed Products (number of images)	Classification rate
UHT (22) Pasteurized (22)	95,5 % 100 %
UHT (22) Pasteurized (22)	95,5 % 90,9 %
UHT (22) Pasteurized (22)	100 % 86,3 %

FIGURE 3 : Classification of biological products extracted from the same species.

de cristallisation a été étudiée car elle évolue en fonction de l'additif biologique. Des méthodes statistiques comme la méthode MPT (Mesures des Propriétés Tonales), mais aussi des méthodes fondées sur l'étude de la matrice de cooccurrence de paires (méthode SGLDM, NGLDM en particulier) ont été étudiées, ainsi que la dimension fractale de ces images (utilisation de la méthode des boîtes) et le nombre de pixels binarisés après seuillage global de l'image (seuillage par diffusion de l'erreur). Ce travail a permis d'extraire un maximum de 18 paramètres caractéristiques pour chaque image. L'analyse des données est réalisée grâce à l'utilisation d'un classifieur et d'un moteur d'analyse de données. Les résultats obtenus indiquent que l'analyse de la texture permet la différenciation d'additifs différents avec un très fort taux de réussite, tandis qu'elle fournit des résultats insuffisants lors de la détermination des différents stades de vieillissement d'un produit. Il apparaît que la texture est moins sensible aux changements d'état qu'à la nature des produits utilisés.

Caractérisation cinétique (Richard NEUMANN)



R. NEUMANN

Dans le but de comprendre comment les différences d'additifs (différences apportées par l'espèce, le mode de culture, le traitement, la conservation, le vieillissement...) influencent le développement de cristallisations sensibles à des additifs biologiques ou chimiques, nous avons développé un outil travaillant sur des images dynamiques représentatives de l'évolution temporelle de la cristallisation. Les objectifs envisagés lors de la lecture d'images cinétiques sont multiples. Ils doivent permettre, à la fois, la compréhension du processus physique conduisant à ce type de cristallisation mais aussi la simplification des images afin d'isoler leur structure.

C'est l'extraction de la vitesse d'avancée du front de cristallisation qui permet d'appréhender les lois de croissance de ce type de cristallisation. Une méthode originale de suivi de cristallisation a été développée et les expérimentations sur des cristallisations avec différents types d'additifs ont permis l'extraction d'une loi de croissance en $(a t^\pm)$.

Le deuxième objectif concernant l'étude de la cinétique de cristallisation vise à simplifier l'image afin d'isoler sa structure. Des travaux précédents menés sur des images statiques ont permis l'extraction d'un squelette qui présentait de nombreux défauts. L'image squelettisée ressemblait parfois à une mosaïque et il était impossible de suivre une dendrite correctement.

Notre objectif fut donc d'utiliser la croissance de l'image de façon à extraire une structure fidèle

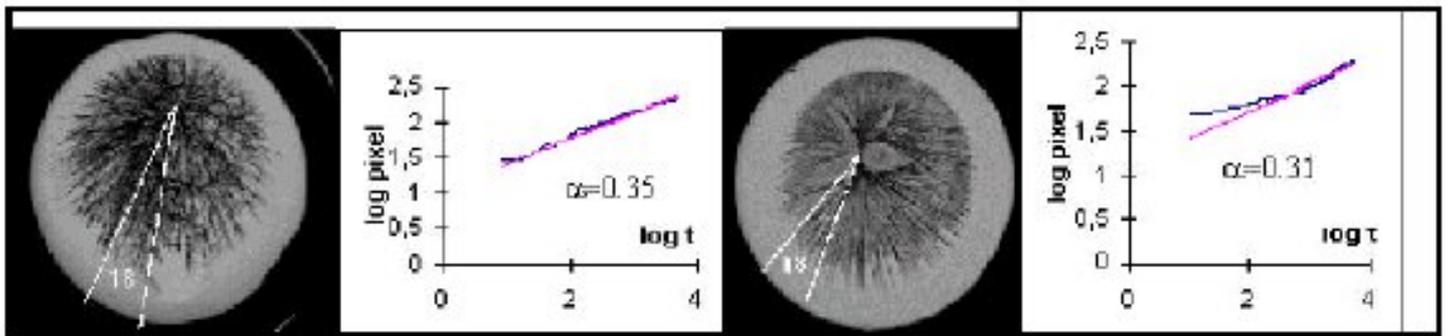


FIGURE 1 : Representation of sector 18 for pure CuCl₂
 Evolution of its trajectory and approximation by a ligne of a slope.
 Representation of sector 18 for CuCl₂ with ovalbumine.
 Evolution of its trajectory and approximation by a ligne of a slope.

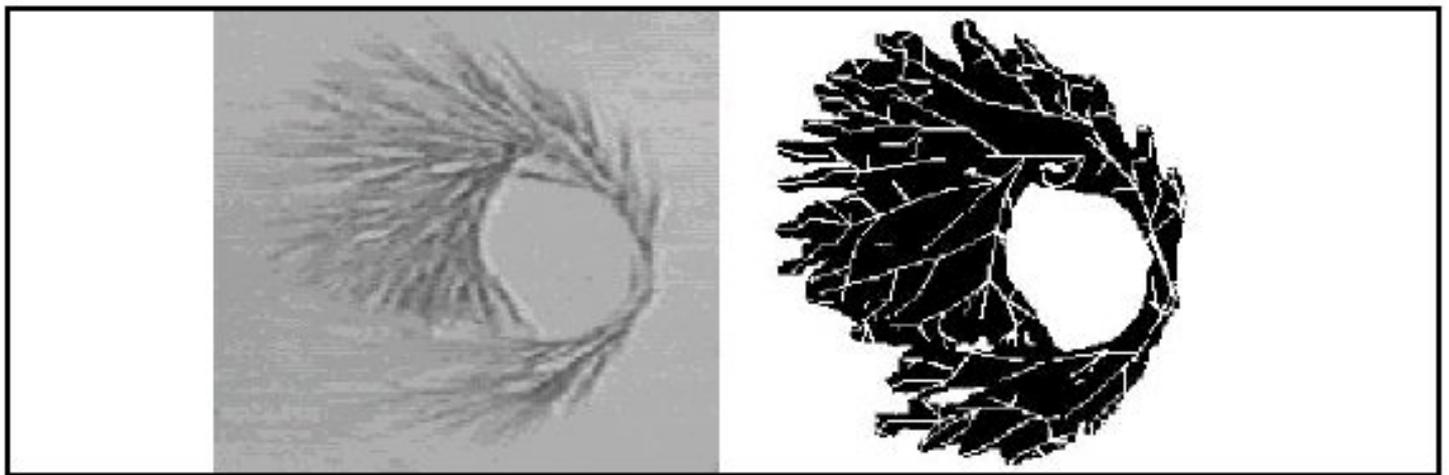


FIGURE 2 : Original image
 Some image binarized with the structure extracted from dendrite tips tracking.

à celle-ci et à son squelette mais qui soit interprétable afin de pouvoir suivre l'évolution de nombreux paramètres tels que la distance parcourue, la déviation angulaire de dendrites spécifiées ainsi que l'étude de la filiation de chaque noeud.

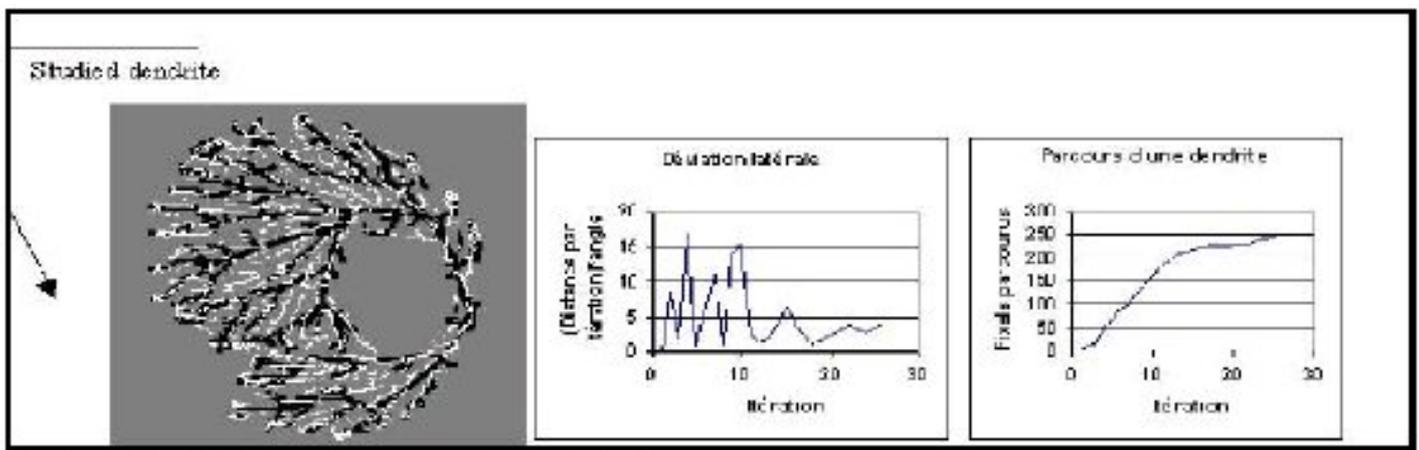


FIGURE 3 : Evolution of specified parameters

- Comparison of the structure extracted from dendrite tips tracking of the same crystallization as in figure 2 with its skeleton.
- Displacement of the dendrite.
- Lateral deviation of the dendrite per iteration.

La mise en place de cette méthode a nécessité l'élaboration d'une méthode d'extraction de sommets de dendrites et de suivi de sommets au cours du temps. Les résultats montrent une structure de croissance proche du squelette mais dont toutes les ramifications sont connues. La validation morphologique de cette arborescence a été réalisée grâce à sa comparaison avec le squelette de l'image.

L'utilisation des techniques de l'analyse d'image et le développement de méthodes originales et spécifiques de la croissance dendritique nous permettent de proposer des outils d'analyse, tant statiques par la classification des images terminales, que cinétiques par l'utilisation des images intermédiaires, qui permettent d'atteindre la texture des images, leur structure ainsi que des paramètres physiques cinétiques. Ces paramètres apportent des informations sur l'influence des additifs sur les mécanismes de croissance. Ces outils peuvent être adaptés à d'autres situations expérimentales. Cependant un travail important reste nécessaire pour le choix et l'interprétation de ces paramètres.

Influence de champs électriques et magnétiques

(Dominique CHARPENTIER¹, J-G BARTH², M. COCUBE³)

1)D.CHARPENTIER : INERIS Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques.

2)Laboratoire de biochimie-coagulation. Centre hospitalier André BOULLOCHE 25209.

3)Président de la CORSS, Ministère de l'Economie des Finances et de l'Industrie. 75 005 PARIS.



La cristallisation de solutions de chlorure cuivrique additionnées de différents ajouts chimiques ou biologiques tels que sucres de végétaux, sang humain, produit des cristallisations bien différentes de celle du chlorure de cuivre pur. Elle nous renseigne sur ces additifs s'il existe un lien systématique entre la cause et l'effet.

L'objet de cette étude est d'étudier l'effet des rayonnements électromagnétiques, considérés comme phénomènes perturbateurs pouvant influencer la cristallisation et produire des variations du résultat pour un même produit, toutes les autres conditions expérimentales étant inchangées (température, hygrométrie, mode de préparation des solutions, ...).

L'expérimentation a consisté à produire dans une enceinte des champs magnétiques et électriques d'intensité était de 10 à 1 000 fois supérieure à celle des champs ambiants (champ magnétique inférieur à 100 μ A/m dans la bande de 10 kHz à 1 MHz et champ électrique inférieur à 3 mV/m de 10 kHz à 1 GHz) et d'analyser l'effet de ces champs sur les cristallisations

Les champs magnétiques ont été produits dans la bande de 0,01 Hz à 200 kHz en polarisation horizontale et verticale, avec une amplitude variant de 10 mA/m à 200 mA/m.

Les champs électriques ont été produits dans la bande de 0,01 Hz à 200 kHz en polarisation verticale et horizontale.

Des additifs tel que la peroxydase, l'amylopectine,... ont été testés (champ électrique et magnétique) et du sang

Cadre magnétique pour un champ polarisé verticalement

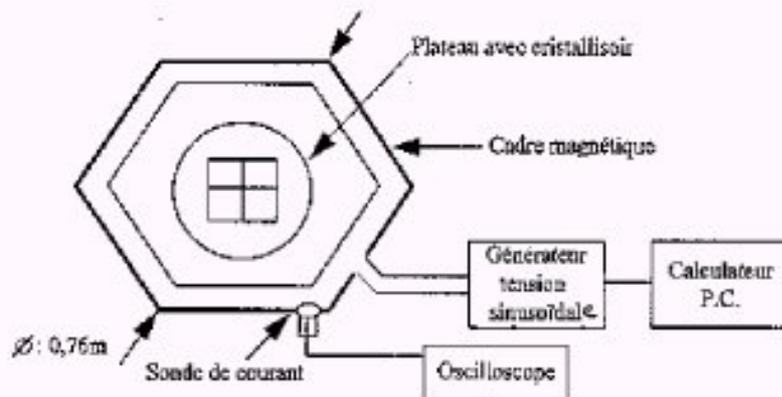
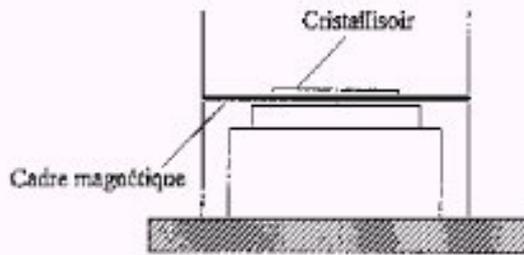


Figure 1
Caractéristiques de cadre magnétique :
hexagone, diagonale = 0.76 m
1 spire, fil de cuivre \varnothing : 0.3 mm

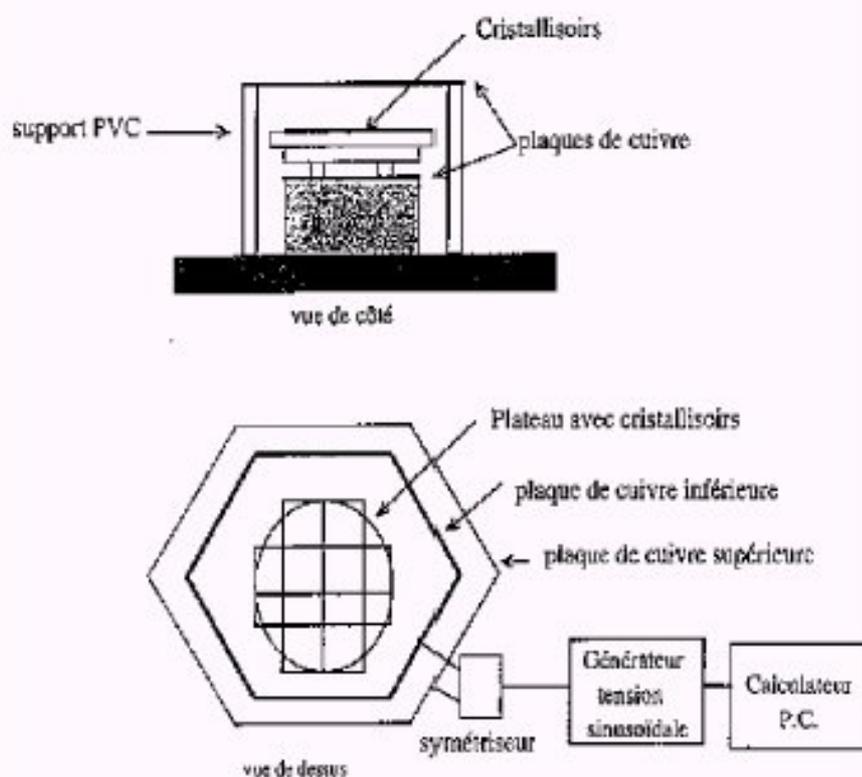
Matériel utilisé pour générer des champs magnétiques verticaux.

humain (champ magnétique).

L'impact des champs électriques et magnétiques, dans les conditions expérimentales et en particulier les bandes de fréquences considérées, avec un balayage en fréquence récurrent durant toute la cristallisation (7 à 8 h), ne modifie pas de façon significative l'aspect des cristallisations.

Condensateur pour un champ polarisé verticalement

Les plaques de cuivre parallèles constituent les armatures d'un condensateur plan.



Matériel utilisé pour générer des champs électriques verticaux

Discussion générale

Q V.FLEURY

Un simple commentaire à partir de la dernière intervention : les images montrées, où les arborescences s'organisent en spirales, sont celles de dépôts de métaux, donc sensibles aux champs magnétiques, un peu comme si chacun des cristaux élémentaires était une petite aiguille aimantée. Il y a donc une sommation d'orientations de ces petites aiguilles aimantées dans le champ, qui amène au niveau macroscopique des formes courbes.

Alors, cela dit, dans les images que vous avez montrées, M BARTH, il y a des *concavités* qui sont formées par l'intersection de la courbure des petits grains filamentaires individuels. Or ce n'est pas complètement apparent quand vous faites un agrandissement des images, on voit plutôt des bâtons assez rectilignes. Est-ce que ces bâtons apparaissent comme rectilignes seulement parce qu'on les voit de très près alors qu'ils sont effectivement courbes? Ou bien est-ce au moment de la formation d'un nouveau bâton sur celui qui existe déjà qu'une courbure apparaît?

R J-G BARTH

En fait il faudrait examiner les images d'une façon détaillée, à la recherche de centres de germination qui se coordonnent les uns par rapport aux autres. A partir de ces centres de germination, partent des stries, à gauche et à droite, qui finissent par délimiter une forme cavitaire.

Q V.FLEURY

Les cristaux individuels, sont-ils vraiment des aiguilles extrêmement droites, des bâtons, vraiment très droits ?

R J-G BARTH

En effet, ce sont des stries cristallines qui se dirigent de façon rectiligne. Comme il y a différents centres de germination qui apparaissent à gauche et à droite, les stries qui en émanent finissent par définir un pourtour.

Q V.FLEURY

Ce qui n'est pas résolu, c'est pourquoi globalement il y a giration ? Visiblement, dans les images, les éventails qui apparaissent ont une courbure. Donc, si un additif modifie la courbure, on va avoir des formes de cavité différentes ou des rosaces. Quelle en est la cause ? M.NEUMANN a évoqué la mesure de cette courbure, et vous avez dit que lorsqu'on mesurait au fil du temps la croissance d'une dendrite, cette courbure devenait, je crois, plus faible avec le temps. Au début c'est très serré et après, sur la fin, c'est plutôt très droit ; est ce que c'est un effet de l'épaisseur du liquide dans la boîte ?

Au début de la cristallisation, surtout avec du lait, il y a des courbures très importantes et en fin de cristallisation, on note une disparition de toute courbure, les dendrites deviennent complètement rectilignes. A partir de ces observations, et en essayant d'étudier ces courbures, on trouverait peut-être des choses caractéristiques des cristallisations.

Dans l'expérience que vous montrez, au fur et à mesure que cela s'agrandit, la croissance ralentit. Plus on s'approche du bord, moins il y a de liquide. Donc, il doit y avoir une corrélation entre la vitesse de croissance et la courbure.

R R. NEUMANN

Oui. En fait, il y a aussi une corrélation avec la concentration des additifs. Il y a moins de chlorure de cuivre et les additifs sont peut-être repoussés vers le bord de la cristallisation. Il en résulterait une restriction du champ de fluctuation des dendrites.

A la fin on arrivait à avoir des dendrites poussant de façon très lente, mais aussi de façon rectiligne, puisqu'elles n'avaient plus le choix de leur direction.

R M. COCUDE

En fait, on raisonne à présent au vu d'images planes. Mais ce sont vraiment des configurations en trois dimensions. Il y a une dizaine d'années, des examens avaient été effectués à l'Ecole des Mines de Paris. Dans les cristallisations de chlorure cuivrique avec additifs sanguins des formes vacuolaires apparaissaient dans des enchevêtrements, des superpositions de cristaux rectilignes et non des dendrites avec des cristaux en continuité. Mais ces "vacuoles" n'avaient pas un périmètre, un pourtour continu. L'aspect de continuité et de forme était le résultat d'un effet de perspective (projection d'une réalité tri-dimensionnelle).

Q Ph. DESBROSSES

J'ai entendu qu'il y avait des contrôles physiques très rigoureux, mais je n'ai pas entendu par contre qu'il y avait un contrôle de l'air.

Est-ce qu'une présence bactérienne peut modifier les résultats, est-ce que la composition chimique de l'eau qui sert de support a été étudiée ?

R J-O. ANDERSEN

En ce qui concerne l'infection microbienne, la concentration de chlorure de cuivre dans la solution est telle qu'il y a un effet létal sur les bactéries.

Q V. SIESO

Vous avez insisté sur la préparation de l'échantillon avant de faire la cristallisation proprement dite. Or, si l'on prend - par exemple - le lait U.H.T., le lait frais ou pasteurisé, il s'agit au départ d'échantillons différents. Cela dit, avant de pratiquer la cristallisation, on opère une transformation de l'échantillon, de façon à le combiner avec du chlorure de cuivre. Faut-il veiller grandement à réunir des conditions tout à fait semblables au niveau d'échantillons au départ différents ? N'y a-t-il pas un risque d'introduire des fluctuations dans le traitement de l'échantillon lui-même ?

Vous avez aussi parlé d'extraits végétaux. Vous ne partez pas de la matière brute, vous la traitez, autrement dit vous modifiez l'échantillon au départ, même si par la suite vous conservez des conditions identiques dans la cabine de cristallisation. Cela ne va-t-il pas influencer le résultat de la cristallisation ?

R J-O. ANDERSEN

Quelle que soit la technique utilisée, il y a un certain effet. Sur trois méthodes utilisées pour dégivrer un produit congelé, nous avons obtenu trois images différentes.

On peut aussi travailler sur des jus de carotte, des extraits de carotte.

Q V.SIESO

Est-ce que le traitement de deux échantillons différents de lait est absolument le même au départ? Prend-on cette précaution qui me semble tout à fait indispensable ? Cela sera évoqué cet après midi, ce n'est pas la peine de s'étendre beaucoup. Suivant la façon dont on peut traiter un échantillon donné, le sang du même individu par exemple, on va obtenir des choses différentes. Donc, au niveau de l'échantillon, végétal, lait, ou autre, il faut faire très attention.

R J-O. ANDERSEN

Oui, absolument.

R M. COCUDE

C'est tout le problème de la fiabilité de la méthode.

Q V.FLEURY

Quand on veut faire des gros cristaux de manière reproductible, en général on place un germe intentionnellement, de façon à être sûr de l'endroit où la cristallisation démarre. Procédez-vous de la même façon ? Par exemple, en électrolyse, on est certain que cela va partir de l'électrode. On est sûr d'avoir des images très radiales, cela améliore la géométrie du système. Est-il compatible avec votre procédé de mettre un germe quelque part ?

R J-G BARTH

Nous ne l'avons jamais fait.

R R.NEUMAN

Nous avons essayé de placer le germe dans une position définie en faisant des trous sur les plaques, de façon à faciliter la nucléation à cet endroit là. Nous n'avons pas obtenu de résultats très prometteurs. Le physicien nous avait dit de faire cette manipulation pour avoir une nucléation quasi certaine sur ce point mais nous n'avons obtenu ce résultat qu'une fois sur deux. C'est un thème intéressant que nous aimerions approfondir. Pouvoir contrôler le point de nucléation, notamment pour la cinétique, serait intéressant.

III. CORRELATION ENTRE STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ADDITIF ET IMAGE

Corrélation entre structure chimique de l'additif et image (J-G. Barth)

Discussion générale

III ²CORRÉLATION ENTRE STRUCTURE

Chimique de l'additif et image (Jean-Georges BARTH)¹

1 Laboratoire de biochimie-coagulation. Centre hospitalier André BOULLOCHE 25209 MONTBELIARD



Quel est le rôle de la structure chimique de l'additif dans la formation des images cristallographiques ? Pour répondre à cette question, des additifs de structure chimique connue tels que des dérivés carboxyliques en C2, C3, C4 et C5, ainsi que des polymères naturels ou synthétiques comportant des protéines, ont été étudiés. Des relations entre certaines propriétés chimiques des additifs et les images obtenues par cristallisation sont évidentes mais le mécanisme de leur formation n'est pas expliqué. Ces premières expériences font apparaître les éléments suivants :

Les groupements fonctionnels fortement polaires, tels que les fonctions carboxyliques ou sulfoniques, favorisent la texture tandis que la fonction amine favorise la structure.

Il faut nuancer ce résultat par le fait que l'augmentation de la concentration d'additif favorise également la structure.

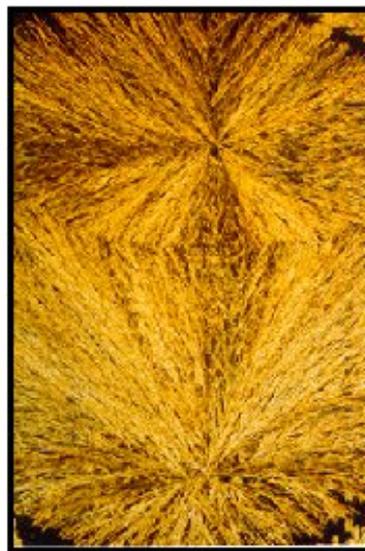
- Les groupements



Acide-L-cystéique
3 µg/ml.CuCl₂
75 µmol/ml.



Poly-L-Lysine
109 µg/ml.CuCl₂
75 µmol/ml.



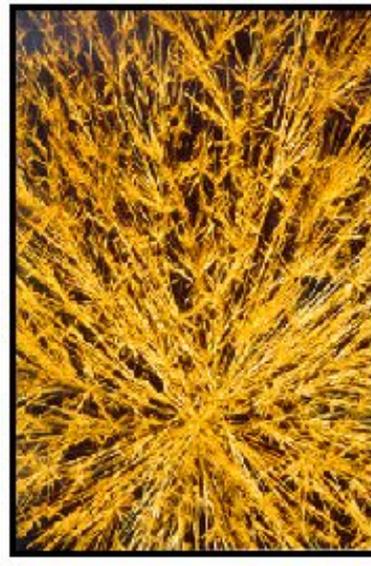
Poly-L-Glutamate
109 µg/ml.CuCl₂
75 µmol/ml.



Glycogène
350 µg/ml.
CuCl₂
75 µmol/ml.



Amylopectine
25 µg/ml
CuCl₂ -
75 µmol/ml



Inuline
350 µg/ml
CuCl₂
75 µmol/ml

fonctionnels peu polaires (alcool, mercaptan, et mercaptan substitué) augmentent l'influence de l'additif sur la cristallisation.

- La nature du monomère constituant un polymère homo-gène, ou, dans le cas des protéines, la structure primaire, semblent être des éléments importants de la différenciation des images.

- La structure tridimensionnelle pourrait jouer un rôle important comme le montrent les expériences comparatives avec différents glucosanes : des ramifications courtes, de 10 à 15 résidus glucose, densément réparties (tous les 3 à 5 résidus glucose) conduisent à des images totalement différentes de celles obtenues avec un glucosane à ramifications très courtes (1 à 2 résidus glucose) ou longues (20 à 33 résidus glucose) réparties sur la chaîne principale seulement tous les 20 à 33 résidus glucose.

D'autres travaux devraient compléter ces résultats sur le rôle des groupements fonctionnels et confirmer celui des structures primaires et tridimensionnelles des polymères et des protéines. Ces résultats permettent d'envisager la description de chimiotypes cristallographiques caractéristiques de grandes classes de substances naturelles.

BARTH J.G.(1997): Image de cristallisation du chlorure cuivrique et Nature de l'additif. *Elemente der Naturwissenschaft* N° 66, p.16-42.

NB : La couleur des six illustrations reprises de cet article s'explique par le fait qu'il s'agit de clichés pris en lumière polarisée.

Discussion générale

Q V. SIESO

On a étudié deux types de substances fondamentales du vivant : les protéines ou les acides aminés et les glucides. Qu'en est-il de la troisième grande famille, les lipides ? Je suppose que c'est peut-être un problème de solubilité au départ ?

Ma deuxième question porte sur les images que vous avez montrées. Vous avez souvent employé les adjectifs "image intéressante" ou "représentative" ou "pertinente" ce qui suppose que vous avez fait une série d'images dont vous avez écarté certaines qui n'étaient pas représentatives ou intéressantes.

R J-G BARTH

Bien sûr, pour être tout à fait didactique, et convaincant, j'aurais dû vous montrer toutes les séries d'images obtenues pour un additif donné. Par exemple pour les acides aminés la S-méthyl-systéine, j'ai étudié une gamme de concentrations de 3, 6, 9 micromoles d'additif dans le mélange; on constate, lorsque les quantités d'additif sont supérieures à un certain niveau, que l'image de la cristallisation devient atypique, et il n'est plus possible de distinguer ce qui est dû à l'additif. La même remarque vaut pour des concentrations faibles : lorsque les concentrations de l'additif sont trop faibles, c'est l'image du chlorure cuivrique pur qui domine et il n'est donc pas possible d'attribuer un caractère spécifique à ces deux extrêmes. C'est une règle générale pour les personnes qui pratiquent les cristallisations sensibles que d'être confrontées à ce problème de zone de concentration dans laquelle les images ont un rapport avec l'additif étudié. Je vous ai aussi parlé du glycogène dont les images changent en fonction de la concentration d'additif. Lorsque les concentrations sont faibles, les images ressemblent à celle du chlorure cuivrique pur ; lorsque les concentrations augmentent, vous voyez les images que je vous ai montrées. Naturellement, il aurait été justifié de montrer toutes les images de tous les additifs pour que vous soyez convaincus de ce que je vous ai dit.

La deuxième question est celle relative aux additifs lipidiques. Je n'en ai pas étudié, et je crois qu'effectivement on serait confronté à un problème de solubilité qu'il faudrait surmonter.

Commentaire V.SIESO

Nous, nous avons fait des expériences en prenant non pas un composé simple et unique à des concentrations variables, mais en prenant déjà un mélange de deux composés simples : on observait des images variées. D'autre part quand vous dites que probablement c'est la structure primaire qui intervient plutôt que la structure tridimensionnelle tertiaire, ce n'est pas évident du tout. Quand on mélange la protéine en question dans le chlorure de cuivre je me demande si ce n'est pas déjà un milieu fortement dénaturant donc qui annihile la structure tertiaire, ou alors, si ce n'est pas le cas, on pourrait par des manipulations préalables dénaturer la protéine de façon à lui faire perdre la structure tertiaire et analyser l'image de la cristallisation après dénaturation.

R J-G BARTH

J'ai fait des expériences de ce genre, qui consistent à utiliser des enzymes, par exemple l'uréase ou bien la trypsine que l'on chauffe. On vérifie que le traitement thermique a fait disparaître l'activité enzymatique. On peut en conclure que la structure fonctionnelle de la protéine a changé puisque l'activité enzymatique n'est plus décelable. En comparant les images de l'enzyme native et de l'enzyme traitée, on constate tout de même des différences d'image entre les deux additifs, l'un traité et l'autre non traité. Donc l'idée que la structure tertiaire puisse néanmoins jouer un rôle n'est peut-être pas à écarter, mais il faut dire immédiatement après, que le traitement thermique modifie certainement beaucoup plus de

choses qu'on ne croit. On ne peut pas le contrôler simplement, il faut étudier les modifications introduites avant de pouvoir conclure que c'est la structure tertiaire ou d'autres modifications éventuelles de la structure primaire qui ont été induites par le traitement thermique.

IV. APPLICATIONS MEDICALES

Principes généraux - Indicateurs de risques (M-Th Piva)

Etude de cas individuels (M-Th Piva)

Configuration cristallographique de cristaux de chlorure cuivrique hydraté avec une petite quantité de sang de diabétique (T. Shibata)

Perspectives d'utilisation (V. Sieso)

Discussion générale

IV 2 APPLICATIONS MÉDICALES

Principes généraux - Indicateurs de risque (Marie-Thérèse PIVA)¹



1) Laboratoire de Biochimie Médicale B - U.F.R de Médecine, Institut de Biologie - Boulevard Henri IV - 34060 Montpellier et Service de Biochimie Médicale B - Hôpital Saint - Eloi, Avenue Bertin Sans - 34295 Montpellier - (France)

1 - Patients hospitalisés au CHU de Montpellier

Inspirés par les travaux de E. Pfeiffer et de A Selawry (1957) utilisés en médecine dans le cadre d'un test permettant l'orientation diagnostique, nous avons appliqué et adapté leur méthode sur un groupe de Patients hospitalisés en médecine interne et un groupe de sujets « bien portants ». Cette méthode est fondée sur l'étude des formes que prend, à l'évaporation, une solution aqueuse de chlorure de cuivre en présence de sang.

Nous avons étudié les différentes images ou « Formes » observables lors de la cristallisation du chlorure de cuivre

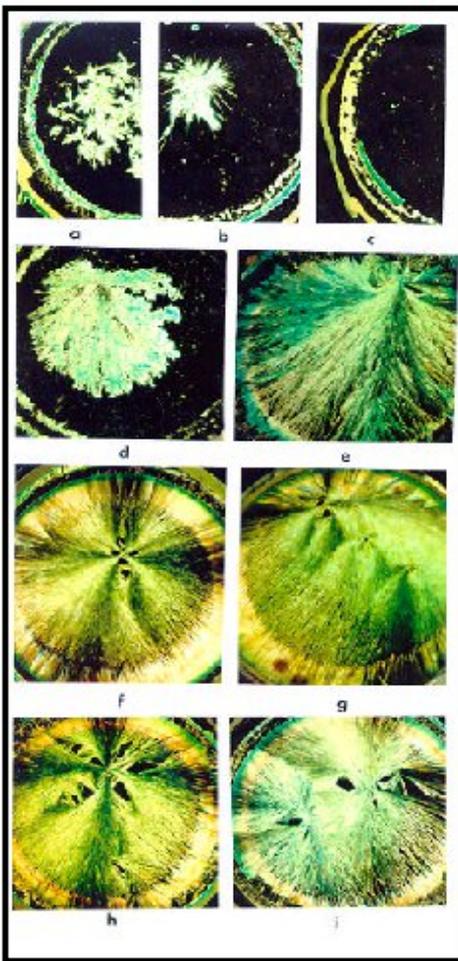


Fig 1 Formes de cristallisations observées.
a,b,c : acides aminés.
e : sérum albumine.
f, g, h, i : sang de patients

en présence de sang dans un système plan bidimensionnel et circulaire (fig 1). Nous avons décrit les différents aspects techniques de la méthode et nous avons défini les conditions techniques optimales d'obtention de ces images. Chez des sujets « bien portants » (choisis comme témoins), la cristallisation est plus régulière que chez les sujets malades. Dans l'étude menée sur 80 patients répartis en 8 groupes pathologiques, la cristallisation présente des altérations ou figures géométriques. Les différentes figures obtenues ou “ Formes “ sont répertoriées et schématisées.

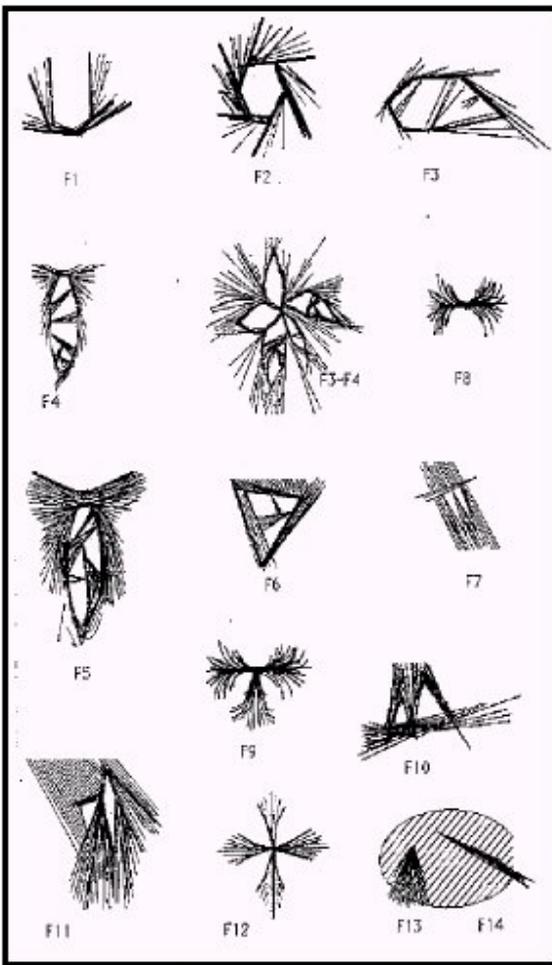


Fig 2 :Schéma des différentes "formes".

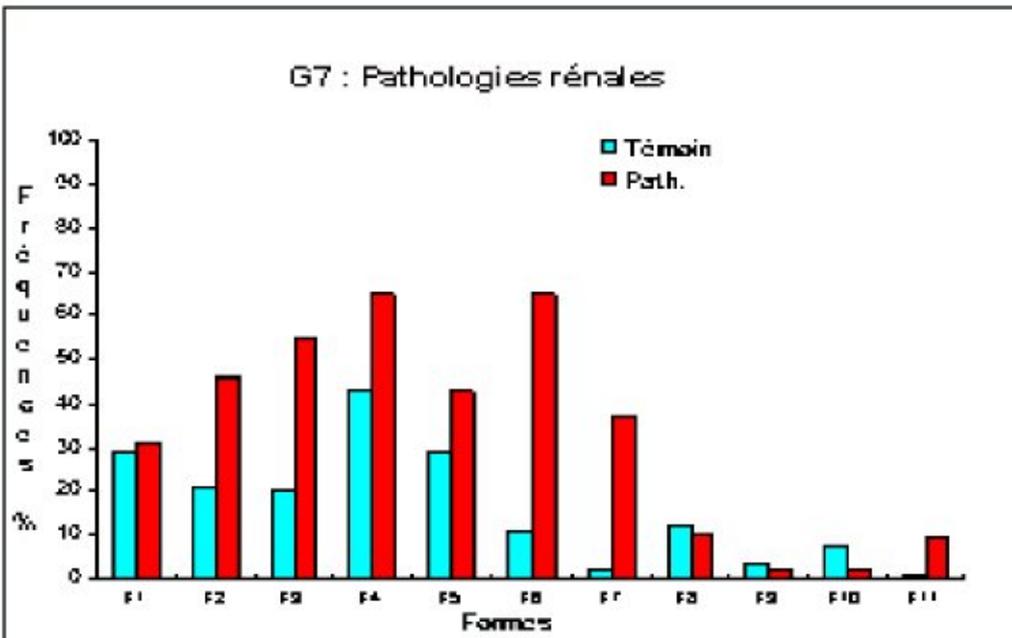


Fig 3 a Comparaison d'histogrammes montrant les profils de forme :

► **Pathologies rénales et profil témoin.**

Nous avons essayé de comprendre la formation des différentes configurations de cristallisation. Un protocole expérimental portant sur des milieux moins complexes que le sang (solutions d'acides aminés simples, dilutions de sérum-albumine, protéines, polymères) montre l'importance de mélanges

protéiques complexes et leur influence dans la genèse et le développement des formes.

L'étude statistique met en évidence des différences significatives entre la plupart des groupes de patients d'une part, et d'autre part une relation entre la fréquence d'une forme de cristallisation et un groupe pathologique. Par ailleurs, la présence de certaines formes est corrélée à des variations connues de taux sériques protéiques.

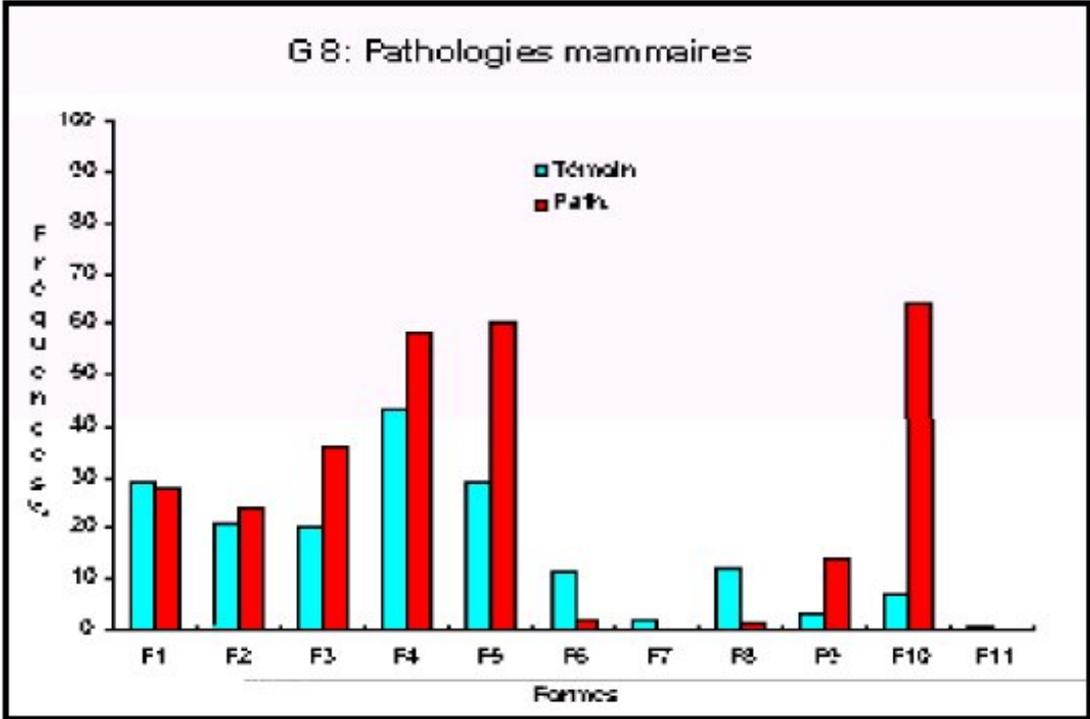


Fig 3 b : Comparaison d'histogrammes montrant les profils de forme :

► **Pathologies mammaires et profil témoin.**

Cette étude met en évidence une correspondance entre une pathologie et une forme et permet ainsi de "visualiser" un état pathologique par image cristallographique. Elle permet de définir pour un certain nombre de formes un seuil de pertinence relatif à la fréquence à partir duquel la vigilance doit s'imposer. Les figures 3 et 4 montrent différents profils de formes.

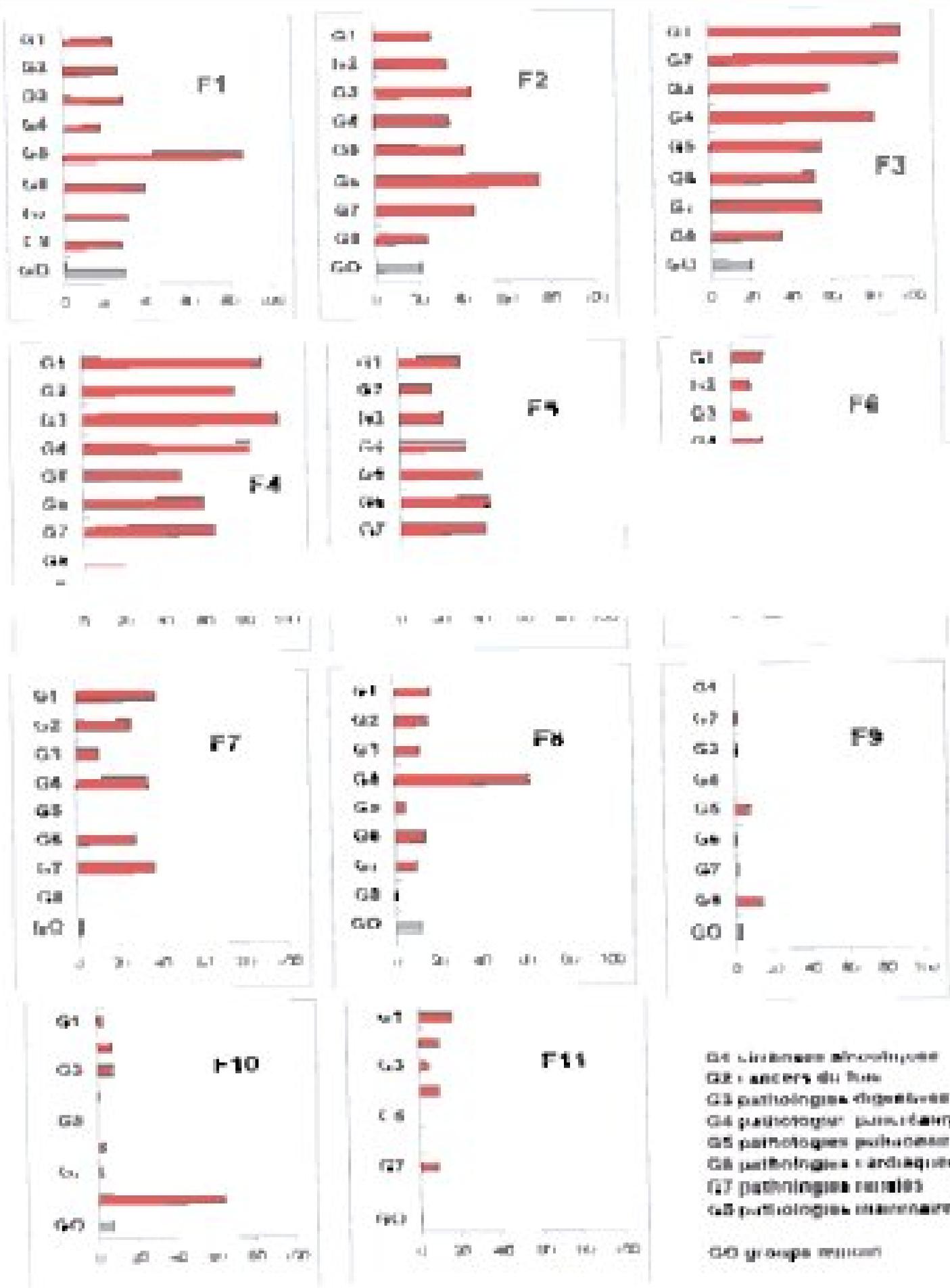


Fig 4 : Histogrammes présentant la fréquence d'apparition des 11 formes dans les différents groupes pathologiques.

2 - Patients et cancérologie

La littérature essentiellement allemande fait état de l'une des principales applications de la cristallisation à savoir

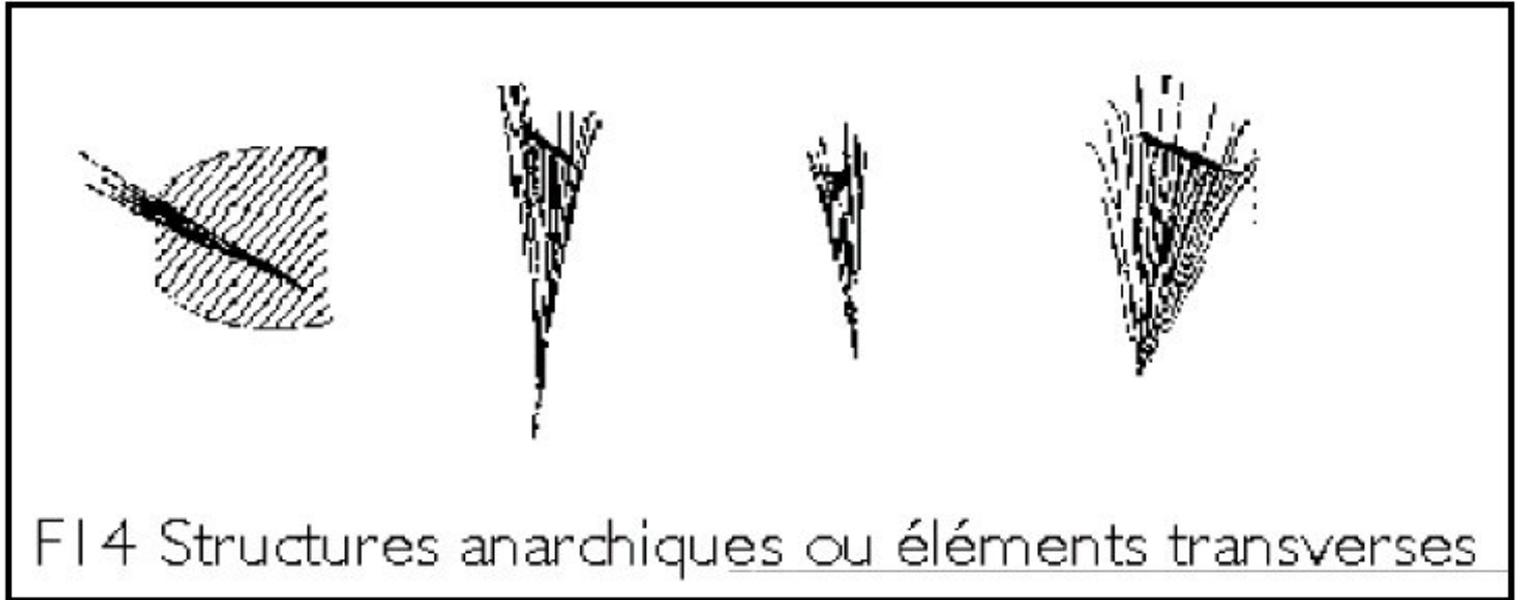
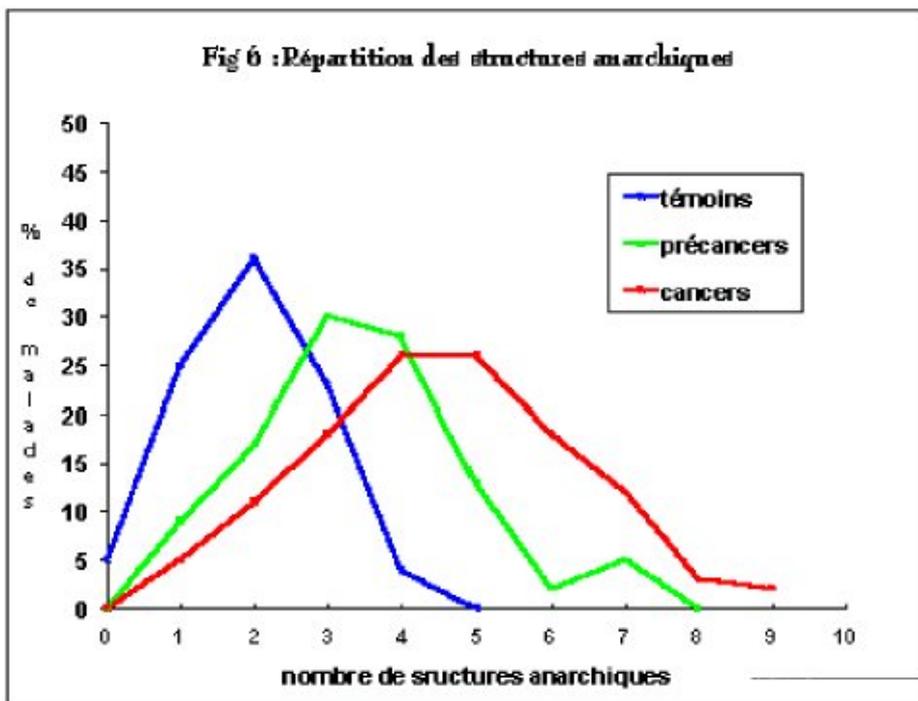


Fig 5 Structures anarchiques ou éléments transverses ou F14

l'élaboration du diagnostic de cancer. Les résultats de ces auteurs montrent que la sensibilité de la méthode varie de 56 à 97% et la spécificité de 83 à 100% selon la nature et le stade du cancer. Les signes corrélés avec le cancer sont dénommés suivant les auteurs soit « structures anarchiques soit éléments transverses ou F14» (Fig 5).



Ces signes sont aussi présents chez un certain nombre de sujets bien portants. Les différents auteurs considèrent que la présence de ces signes chez ces personnes constitue un indicateur de risque de l'apparition d'un cancer puisque de nombreux patients ont vu dans des délais de quelques mois à quelques années leur état évoluer vers un cancer cliniquement décelable.

A ce jour, il existe peu d'études étayées par des statistiques satisfaisantes. Spielberger fait état de différences significatives dans le suivi de 2 populations présentant ou non le signe, la population présentant le signe ayant une fréquence plus élevée de développement de cancer. J.G.Barth souligne l'importance des conditions opératoires dans la variabilité des résultats obtenus. Par ailleurs il met en évidence (Fig 6) pour des conditions expérimentales optimales un seuil de pertinence de $n \geq 4$

structures transverses pour 4 plaques, corrélé dans 80% des cas avec le groupe de patients atteints de cancer. Dans le groupe de sujets indemnes 18% présentent ce seuil et parmi ces patients 78% sont cliniquement définis en état précancéreux. Ces résultats accréditent l'hypothèse que certains signes en cristallisation comme les éléments transverses pourraient être considérés comme de bons indicateurs du risque d'apparition de cancer, d'où l'intérêt d'une étude prospective à long terme.

3 - Médecine du travail

L'étude de Cocude et coll. concernant des patients atteints de la pneumoconiose des houilleurs (l'ancienne silicose) pourrait servir de référence pour toute expérimentation de ce type. Elle comporte le suivi de trois populations d'effectifs sensiblement égaux : une population de pneumoconiotiques reconnus (malades), une population de sujets exposés mais n'ayant pas de maladie déclarée (sujets indemnes), une autres population de sujets non exposés (témoins.). Un signe dit majeur apparaît avec des taux d'occurrence différenciés selon le groupe testé, respectivement 61%, 53% et 22%. 96% des malades porteurs du signe connaissent une aggravation de la maladie dans les trois ans. La corrélation entre la présence du signe et l'aggravation tombe toutefois à 70% si on tient compte des malades non porteurs du signe qui connaissent eux aussi une aggravation.

Par ailleurs l'analyse multifactorielle discriminante réalisée en fonction de 13 variables statistiquement significatives et représentatives de l'ensemble de la cristallisation (Formes et fond) a permis de classer l'ensemble des sujets en deux groupes dit P et T. La concordance entre ce classement et l'appartenance aux populations de malades et de témoins est de 75% pour chacune d'elles. L'appartenance au groupe P est fortement corrélée avec l'apparition de la maladie (86%). Cette étude montre une bonne concordance entre, d'une part, la présence des signes majeurs et le classement dans le groupe P et l'aggravation de ces patients (97%). Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse que ces données cristallographiques constituent un indicateur du risque d'aggravation ou, quand elle n'est pas manifestée de l'apparition de la maladie. Cette hypothèse pour être confirmée ou infirmée appelle une étude prospective à long terme impliquant un suivi médical et cristallographique des différentes populations : malades, sujets exposés mais non malades, témoins.

Etude de cas individuels (M-Th PIVA)

Laboratoire de Biochimie Médicale B - U.F.R. de Médecine, Institut de Biologie - Boulevard Henri IV - 34060 Montpellier

Service de Biochimie Médicale B - Hôpital Saint - Eloi, Avenue Bertin Sans - 34295 Montpellier - (France)

Les études précédentes ont permis d'établir un certain nombre de bases essentielles pour utiliser cette méthode en pratique médicale à différents égards soit pour une orientation de diagnostic soit pour un "suivi des Patients". Dans ce 2ème cas elle permet de constater soit des améliorations soit des dégradations et ce souvent, bien avant que les signes cliniques ou biologiques ne soient encore visibles d'un point de vue global ou localisé aux différents organes. Elle permet également un suivi de l'efficacité de la thérapeutique.

Configuration cristallographique de cristaux de chlorure cuivrique hydraté avec une petite quantité de sang de diabétiques (Takashi SHIBATA)

Par Takashi SHIBATA¹⁾, Akemi TANAKA¹⁾, Mitsuko KOGURE³⁾

Tomiko IGUCHI⁴⁾ et Tomoya OGAWA⁵⁾

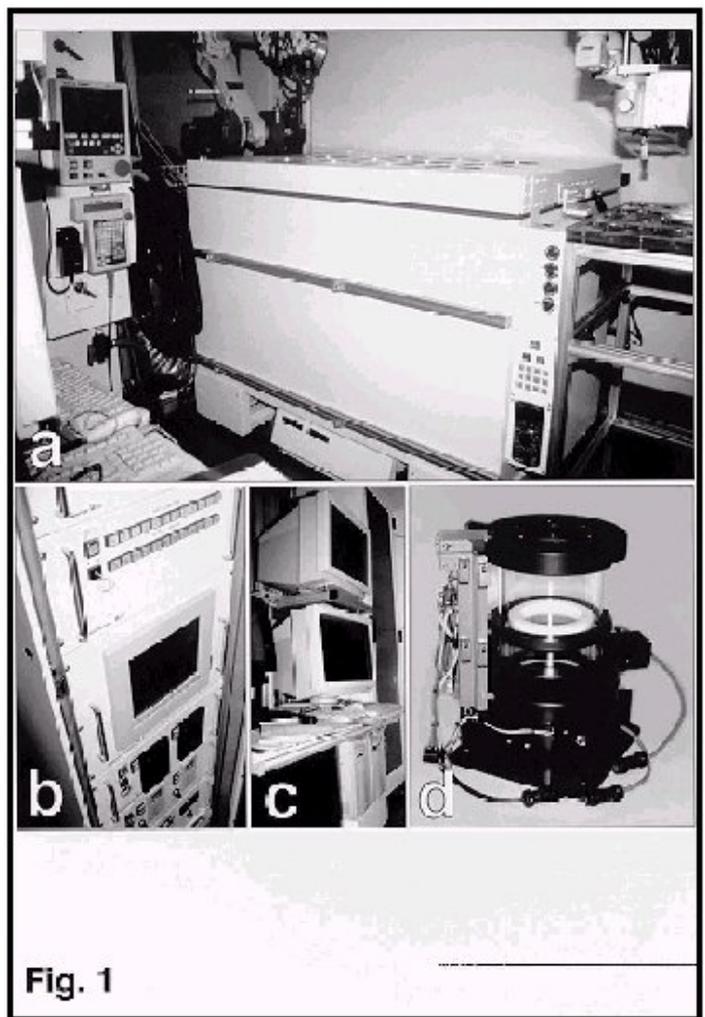
- 1) Department of Anatomy, Tokyo Womens' Medical University
- 2) Department of Psychiatry, Tokyo Womens' Medical University
- 3) Department of Ophthalmology, Tokyo Womens' Medical University
- 4) Institute of Womens' Health, Tokyo Womens' Medical University
- 5) Department of Physics, Gakushûin University



Dans le but d'approfondir l'analyse des mécanismes de croissance, Shibata a mis au point une installation de croissance cristalline gérée par ordinateur, munie d'une fenêtre permettant d'observer le processus de croissance et de divers dispositifs de régulation des facteurs censés influencer sur la croissance des cristaux comme la température, l'hygrométrie et les vibrations mécaniques.

Cet équipement de troisième génération se compose des éléments suivants: 12 ensembles d'unités de croissance cristalline placées dans une chambre de croissance cristalline, un bloc de contrôle de température, d'hygrométrie, de débit d'air et d'autres paramètres d'environnement, des unités d'enregistrement dont une caméra 35 mm, un caméra vidéo à disque laser et un stéréoscope à caméra et vidéo-caméra, une électrode à pH, un capteur laser, un bras manipulateur de boîtes de Pétri, le tout étant actionné par un robot à six axes équipé de mains automatiquement interchangeables et piloté par trois ordinateurs personnels interconnectés. (**Fig. 1**). Il se compose aussi d'un jeu de logiciels propres à contrôler l'ensemble

des systèmes conformément au programme, qui délivrent en sortie les conditions de contrôle et les résultats d'observation. L'analyse des profils est prise en charge par un logiciel personnalisé.



Avec cet équipement, nous avons découvert que les formes spécifiques de croissance des cristaux dendritiques diffèrent dans une grande mesure selon que le sujet est diabétique [1-2] ou sain. Nous avons analysé la corrélation entre leurs fréquences et près de 90 constituants sanguins différents comme indiqué dans la **table 1** [3]. Les dendrites de chlorure cuivrique hydraté cristallisé en solutions aqueuses de chlorure cuivrique dihydraté ayant reçu *in vitro* une petite quantité de sang prélevé chez six diabétiques et chez six sujets sains pris comme témoins, ont été mises à croître dans des boîtes de Pétri non recouvertes à 28°C sous une humidité relative de 45 %. Alors que les solutions de chlorure cuivrique pur ont donné de multiples nucleus, l'addition de sang à raison de 0,5 p.cent en volume a fortement inhibé la nucléation. L'addition de sang a donc présidé à

une croissance radiale des dendrites formées à partir d'un nombre moyen de sites de croissance initiaux (O) d'environ 1,5 par boîte de Pétri.

Analyses	Items
Index of blood sugar	hemoglobin A _{1c} , hemoglobin A _{1c} , fasting blood sugar
Pancreas function	insulin, trypsin
Serum Proteins	total protein, Alb, α ₁ -G, α ₂ -G, β-G, γ-G, A/G ratio, fibrinogen, ceruloplasmin
Amino acids	quantitative analyses of 41 Amino acids Taurine, Thiophosphorothalamic, Isole, Aspartic acid, Hydroxyproline, Threonine, Serine, Asparagine, Glutamic acid, Glutamine, Saccharose, D-Aminobutyric acid, Foline, Glycine, Alanine, Citrulline, Valine, Cystine, D-Aminobutyric acid, Cystathionine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Histidine, γ-Amino-butyric acid, β-Alanine, γ-Aminobutyric acid, Homocysteine, β-Amino-isobutyric acid, Lysine, Methionine, Histidine, 5-Methylhistidine, 1-Methylhistidine, Carnitine, Aspartic, Tyrosine, Myristic, Oleic, Zingiber, total amino acids total AA, NEAA, EAA, BCAA, EAANEAA, BCAA/Total AA, Fischer ratio
Lipid	total lipid, total cholesterol
Pigment	bilirubin (direct, indirect)
Nitrogen	urea nitrogen, creatinine, creatinine, uric acid
Electrolyte	Na, K, Ca, P, Mg, Cl
Metal	Fe, TIBC, UIBC, Cu
Porphyrin	protoporphyrin
Thyroid gland	total serum thyroxin
Blood counts	WBC, RBC, Hb, MCH, MCHC, Ht, MCV, blood platelet
Morphology	white blood cell, red blood cell

Table 1

Des modèles cristallins ayant la géométrie d'une lentille convexe formée de deux arches dendritiques à proximité du centre du site de croissance cristalline ont été observés. (Fig. 2). Les modes spécifiques de croissance cristalline ont été répartis en trois catégories en fonction du grand diamètre de la lentille convexe: petit (S) < 8 mm, moyen (M) ³ 8 mm mais < 20 mm, grand (L) ³ 20 mm. (Fig. 3).

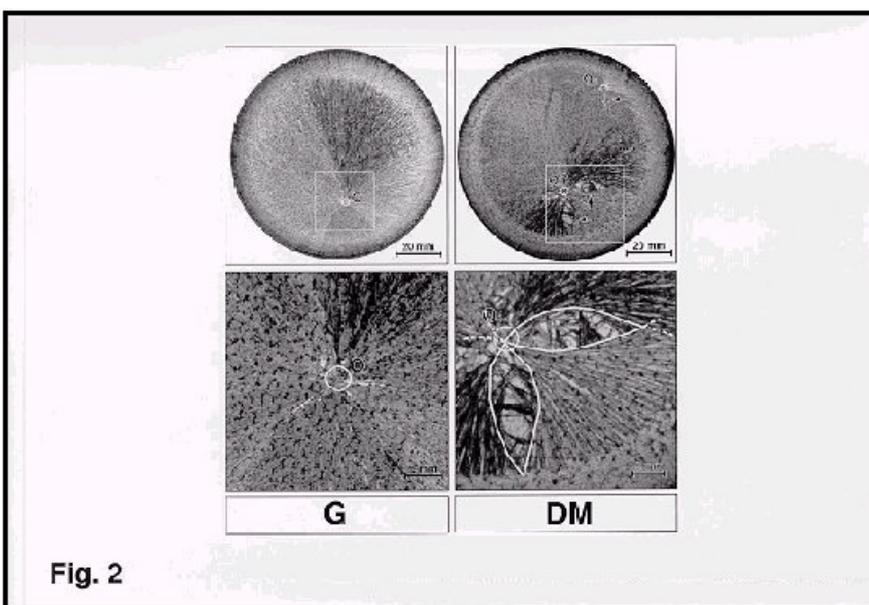
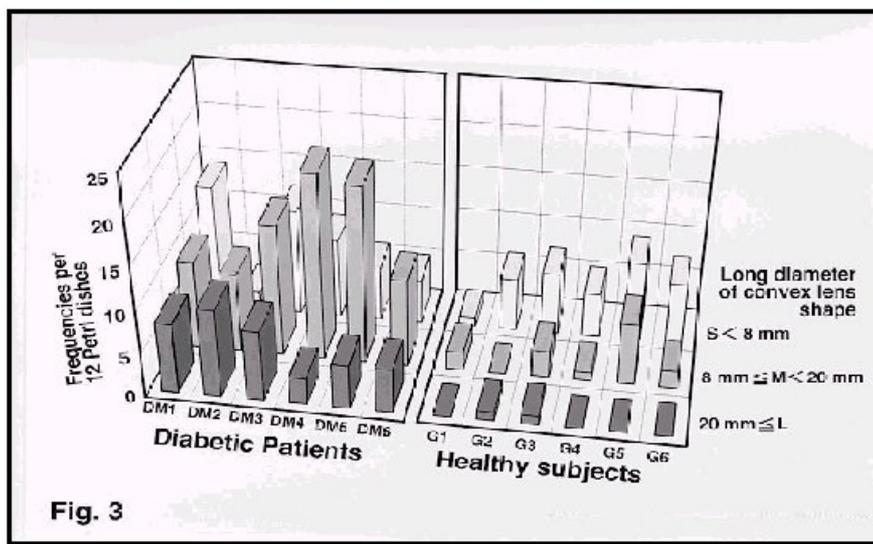


Fig. 2

Des modes de croissance S corrélés avec la concentration sérique ont été produits par le sang tant des sujets sains que des diabétiques, alors que les modes M et L sont restés spécifiques aux diabétiques dans un test *t* de Student, dont les résultats exprimés sur douze boîtes de Pétri ont donné $14,2 \pm 1,4$ formes M en présence de sang de diabétiques contre $2,50 \pm 0,63$ dans le groupe témoin ainsi que $6,50 \pm 0,67$ et $0,33 \pm 0,13$ formes L avec le sang de diabétiques et le sang de



sujets sains respectivement. L'existence de ces formes M et L est apparue dépendante des concentrations de HbA1, HbA1c, glucose, créatinine, acide urique, plaquettes et céruléoplasmine.

Ces résultats montrent que le sang a un effet important sur la croissance des cristaux de chlorure cuivrique hydraté et que différents profils cristallins sont induits selon que le chlorure cuivrique est additionné de sang de diabétiques ou de sang de sujets sains.

Figure 1 : Computer controlled crystal growth and analysis system designed by Shibata. a : Crystal growth chamber and 6-axis robot, b : Electric controller for crystal growth system, c : Computers, d : A crystal growth unit.

Table 1 : Ninety items of quantitative blood analysis performed [3].

Figure 2 : Typical dendritic growth pattern obtained by addition of 0.5 vol% healthy subjects' blood (G) and typical convex lens forms obtained by addition of 0.5 vol% diabetic patients' blood (DM) [3].

Figure 3 : Typical convex lens forms were divided into three categories according to the longer diameter on the convex lens shape : small (S) < 8 mm, median (M) ³ 8mm but <20 mm, large (L) ³ 20 mm. Sums of the three categories in 12 Petri dishes grown simultaneously per person are shown [3].

Références :

[1] **Selawry A und Selawry O** : Die Kupferchlorid-Krystallisation in Naturwissenschaft und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1957).

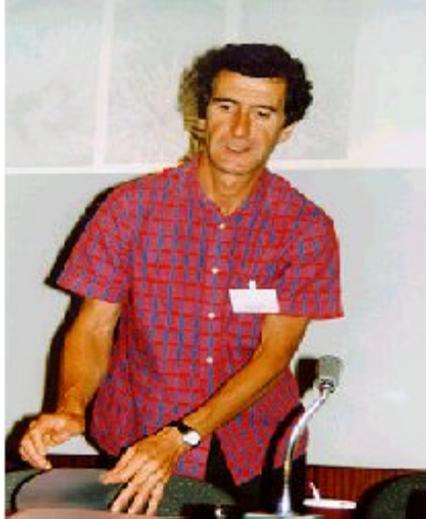
[2] **Piva MT, Lumbroso S, Sieso V et al** : Cupric chloride crystallization with human blood study of pictures obtained in different pathologies . Elemente der Naturwissenschaft 61 : 25-39, 1994.

[3] **Shibata T, Kogure M, Iguch et al** : Effects of Diabetics' Blood on the Growth of Hydrated Cupric Chloride Crystals from Aqueous Solutions. **J Tokyo Wom Med Univ** 6-7 : 346-357, 1998

Perspectives d'utilisation (Victor SIESO)

Laboratoire de Biochimie Médicale B - U.F.R de Médecine, Institut de Biologie - Boulevard Henri IV - 34060 Montpellier

Service de Biochimie Médicale B - Hôpital Saint - Eloi, Avenue Bertin Sans - 34295 Montpellier - (France)



De par la précocité de certaines formes présentes dans la cristallisation et indiquant à l'état latent des perturbations des fonctions des organes, la cristallisation représente un outil intéressant et important qu'il convient d'évaluer dans des perspectives épidémiologiques.

But

Evaluer l'intérêt de la recherche précoce d'un terrain pathologique à l'aide d'un prélèvement sanguin périphérique sur une population adulte réputée indemne de pathologie au moment de l'entrée dans l'étude. Cette population est suivie dans le temps par la technique de cristallisation de chlorure de cuivre selon la méthodologie exposée à la **figure 1**.

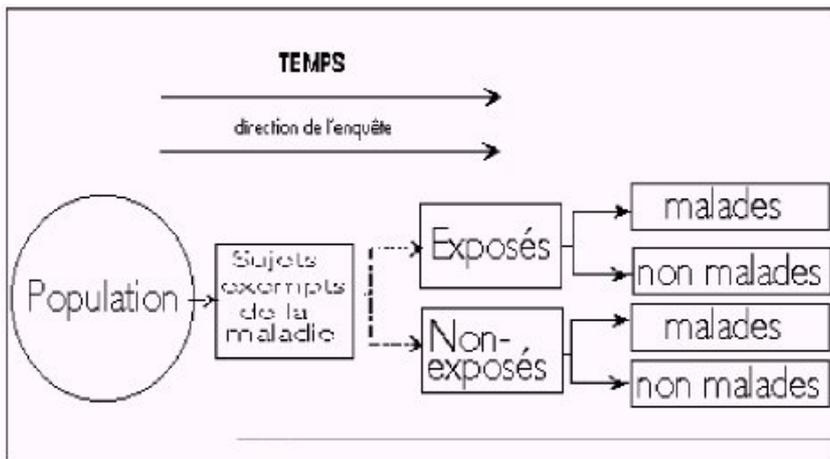


Fig 1 : Enquête de cohorte programmée.

Méthode

Sujets volontaires informés et consentants recrutés parmi :

* la population générale ; non soumise à risque particulier (suivi endogène) **fig 3**.

* le personnel de laboratoire (Biochimie Médicale B, C.H.U Montpellier, dans le cadre de la Médecine du travail)

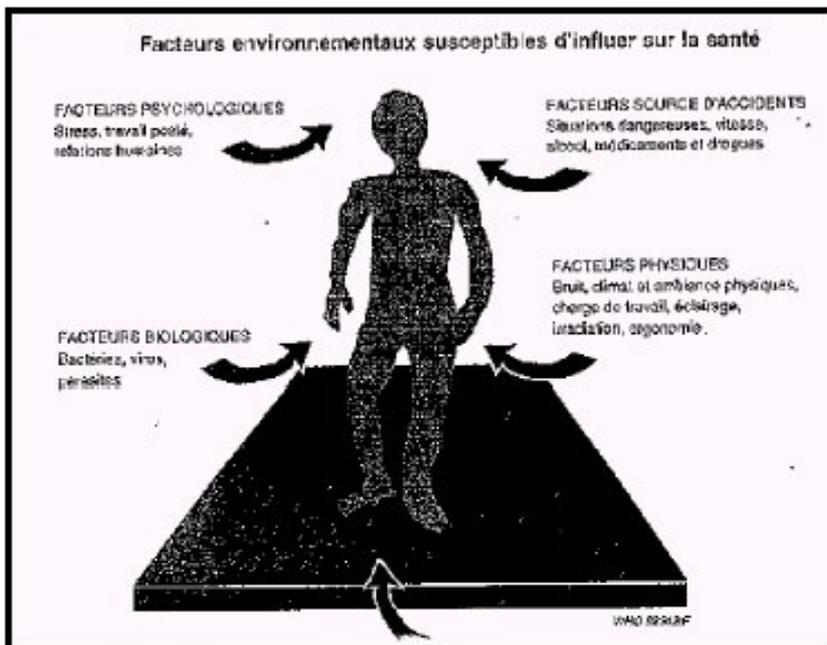


Fig 2 : Facteurs environnementaux susceptibles d'influer sur la santé.

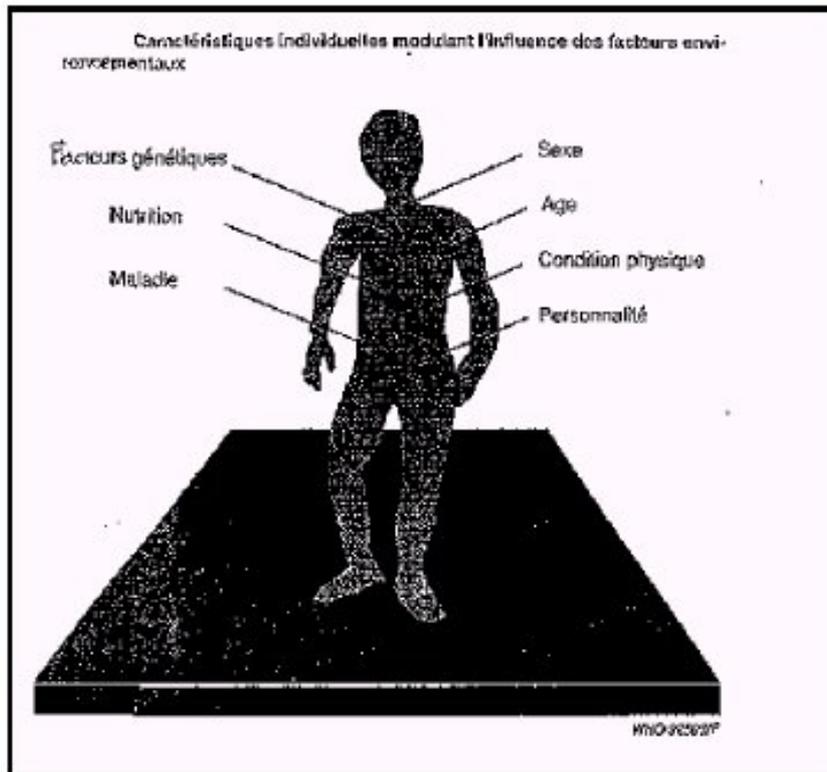


Fig 3 : Caractéristiques individuelles montrant l'influence des facteurs environnementaux

* le milieu Étudiant de la faculté de Médecine (dans le cadre des consultations de médecine préventive

* les patients consultants au service de Biochimie

* une population soumise à risque particulier (**fig 2**) : industries extractives, amiante etc...

Établissement d'une fiche de renseignements médicaux

Analyse statistique des figures de cristallisation; étude de leur évolution sur des prélèvements à 6 mois, 1 an et 2 ans.

Comparaisons, conclusions.

Problèmes

Obtenir le consentement éclairé de la totalité des sujets volontaires (il ne s'agit pas d'un dépistage à proprement parler mais d'une étude préliminaire scientifique)

Obtenir le suivi certain ou obligatoire dans le temps de l'échantillon de population retenu

Faisabilité, acceptabilité, reproductibilité du test employé.

Interprétation des images de cristallisation en relation avec les types de diagnostic

Coût (chiffre en francs, cotation de l'acte en B)

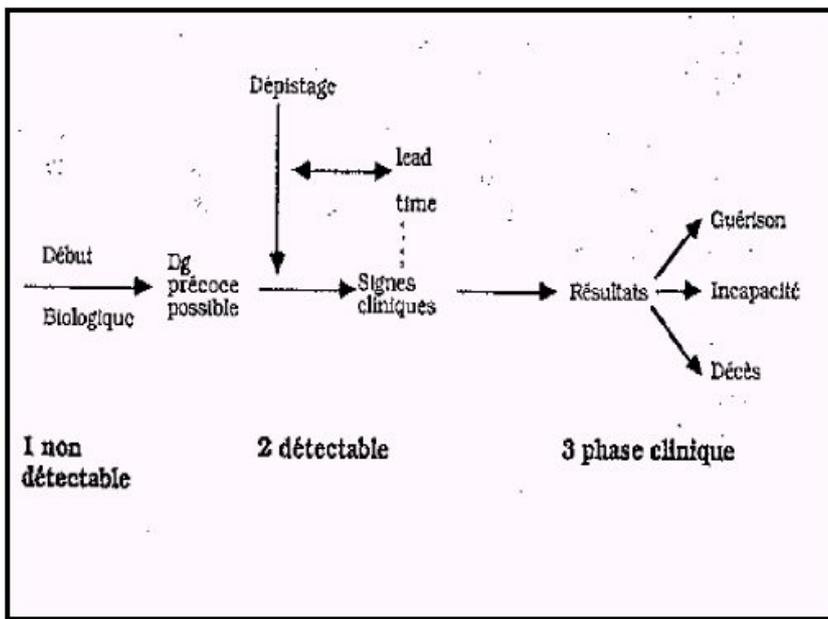


Fig 4 Place de la cristallisation dans le suivi d'une population.

Intérêt, bénéfices attendus

Non pas tant établir un diagnostic, mais *orienter avec pertinence* dans des délais raccourcis vers des investigations plus ciblées (marqueurs sériques, profil protéique, échographie, IRM, tomodensitométrie) (**fig 4**).

Élargir ce type de test de manière plus systématique pour une étude clinique de validation et en faire un test de dépistage dans le cadre d'une prévention secondaire.

Discussion générale

Q M. MARQUET

Je voudrais réagir sur l'étude des pneumoconioses : la cristallographie vous a permis de confirmer un diagnostic qu'on connaissait, puis de constater un potentiel évolutif, ce qui ne m'étonne pas dans la mesure où cette maladie a quand même un potentiel évolutif. Je m'interroge sur le recours à une population de retraités sur qui ont été effectuées les prises de sang^[1] ?

R M. COCUBE

A l'époque des premiers prélèvements les mines étaient encore en activité. Le Dr Amoudru ici présent a suivi de près le début de cette étude. Il y avait deux types de sujets, des personnes en activité et des retraités. Ils étaient suivis par les Houillères soit au titre de la médecine du travail, soit au titre de la surveillance post-professionnelle. Comme l'a indiqué Mme PIVA, il y avait trois groupes de sujets, ceux qui avaient des pneumoconioses reconnues, et ceux qui n'avaient pas de pneumoconiose reconnue mais qui avaient été exposés au risque, et enfin un troisième groupe de sujets non exposés au risque.

Il ne s'agit pas d'un pronostic, mais d'une évaluation du risque d'apparition de la maladie chez ceux qui n'ont pas les signes cliniques et radiologiques de la pneumoconiose, l'objectif initial étant de trouver un indicateur, d'anticiper sur l'apparition de la maladie, en l'absence de signe clinique.

Complément M. MARQUET

Je voyais les choses différemment : et je me demandais si la cristallographie ne permettait pas éventuellement, d'établir la réalité d'une exposition. Je pense particulièrement à une autre maladie, l'asbestose. Y a-t-il une possibilité dans ce domaine ?

R V. SIESO

C'est le but de l'étude qui a été présentée : dans le groupe exposé, on choisirait des travailleurs des industries extractives, des industries de l'amiante et de la porcelaine.

R J-G BARTH

En complément de mon exposé de ce matin, je dois ajouter que si on peut constater une corrélation entre la cristallisation d'un patient et sa maladie quand on la connaît, l'inverse est plus délicat. Les images de la pneumoconiose, que nous avons appelées signes majeurs, apparaissent aussi chez les tabagiques et les cancéreux du poumon. La relation que l'on peut obtenir entre une image de cristallisation particulière et un diagnostic médical est envisageable, avec un certain nombre de précautions, dans un contexte particulier, à condition de tenir compte des fréquences. L'apparition d'images de cristallisation spécifiques attirerait l'attention du médecin sur le fait qu'il y a peut-être un risque important.

Complément M. MARQUET

Apparition de cancers pulmonaires, travail à l'amiante, tabagisme, tout ceci n'est pas toujours évident.

Q B. MAHIEU

Les différents signes repérés sur les plaques de cristallisation sont à considérer comme des traductions d'une altération d'un organe (en l'occurrence le poumon dans l'étude concernant la pneumoconiose des houilleurs). Or, ce que nous espérons mettre en évidence, ce sont les marqueurs précoces d'effets biologiques, si possible spécifiques de chaque pathologie et avant l'apparition de celle-ci.

La méthodologie proposée par M. SIESO est tout à fait adaptée à la détermination d'un marqueur d'exposition ; par contre, la taille des échantillons à suivre (50 personnes par groupe me semble trop faible pour espérer obtenir des différences significatives entre les groupes).

V SIESO

Pour l'étude envisagée il serait intéressant d'avoir une population d'une centaine de personnes.

Il serait intéressant aussi de disposer de l'analyse automatique des images.

T. SHIBATA

C'est le domaine de Mme PIVA et de M. BARTH qui ne me concerne pas particulièrement. Si j'ai bien compris l'aptitude prédictive de la méthode, il y a un décalage entre le moment où la maladie

n'est pas présente et celui où elle apparaît.

Durant cette phase, comme la méthode est très sensible, on peut espérer voir l'évolution sur la surface de cristallisation. Les méthodes physiques d'analyse décrites précédemment (cas des diabétiques) sont applicables.

M. COCUBE

Il y aurait là effectivement une possibilité de suivre une pathologie latente. Cela étant, je pose la question à Mme PIVA : comment utiliser la cristallisation lorsqu'il n'y a pas de signe clinique ?

M-Th PIVA

C'est toute la difficulté de la prévention. Un signe s'exprime, une pathologie potentielle risque d'émerger. On informe le médecin car on ne sait pas comment informer le patient dont on ne connaît pas l'impact psychologique qu'aurait sur lui cette information. La cristallisation sensible a peu d'intérêt dans le cadre hospitalier car il y a d'autres méthodes d'investigation. L'intérêt de la méthode est la prévention, dans le cadre de la médecine générale, mais surtout dans le cas des maladies professionnelles.

M. COCUBE

Il peut aussi apparaître des stress. La cristallisation permet-elle de les mettre en évidence?

M-Th PIVA

On sait que le stress influence cliniquement l'individu. Comme la cristallisation mesure des effets biologiques qui en sont les conséquences, forcément, on risque d'avoir des modifications dans la cristallisation.

[\[1\]](#) La prise de sang se limite à une simple piqûre au bout du doigt. Les gouttes de sang qui apparaissent sont suffisantes pour l'étude cristallographique. (N.D.L.R.)

V.APPROCHE AGRO-ALIMENTAIRE

[Biocristallisation dans la recherche de qualité en agriculture \(J-O. Andersen\)](#)

[Processus de fabrication à partir de végétaux \(J-G Barth\)](#)

[Discussion générale](#)

Biocristallisation dans la recherche de qualité en agriculture

(Jens-Otto ANDERSEN)



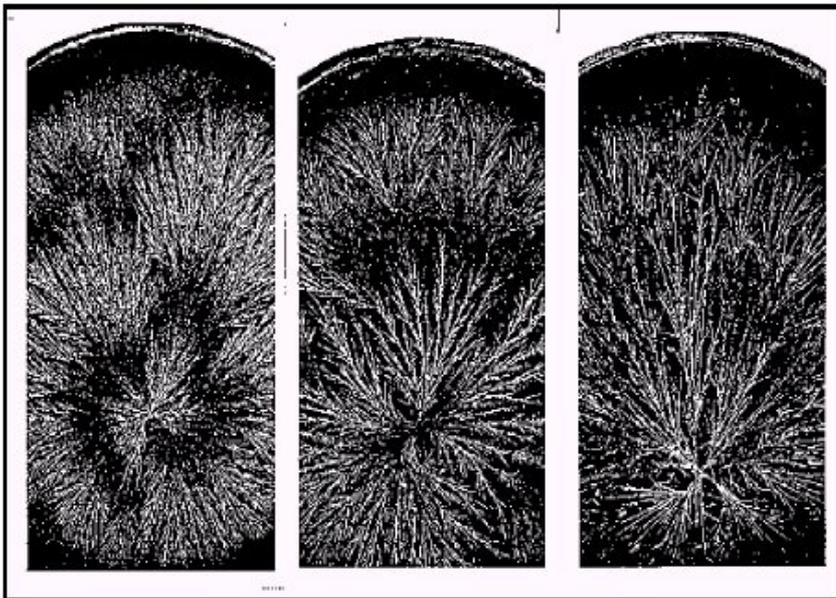
Jens Otto Andersen^a, Christian Henriksen^a et Jens Laursen^b

^aDepartment of Agricultural Sciences

^bDepartment of Mathematics and Physics

The Royal Veterinary and Agricultural University Denmark

La biocristallisation, appelée aussi "cristallisation sensible" et "cristallisation du chlorure cuivrique", a été initialement présentée par E. Pfeiffer dans les années trente. Elle se fonde sur le phénomène cristallographique selon lequel l'addition de substances ioniques inorganiques spécifiques et, d'une manière générale, de toute substance organique, à une solution aqueuse de CuCl_2 dihydraté produit en cours de cristallisation des cristallogrammes offrant des textures dendritiques reproductibles.



Sections from 3 images applied in a computerized image analysis study of degradation of carrot extract over 7 days.

The images represent the days 1, 4 and 7 (from left). The total number of 7x3 images were up to 100% successfully classified.

Parmi les nombreux composés organiques examinés, les protéines et les composés azotés ont la capacité unique d'engendrer des textures complexes et coordonnées, assorties de nombreuses particularités morphologiques aux échelles micro et macroscopique.

De nos jours, cette méthode est principalement appliquée en recherche médicale et agricole. L'étude comparative des effets des différents systèmes d'agriculture et de fertilisation sur la qualité des produits y trouve un champ d'application privilégié. Les exemples présentés illustrent l'application de la méthode en matière de recherche de qualité dans les établissements agricoles ainsi que les

corrélations avec les méthodes traditionnelles de chimie analytique.

Le manque de méthodes types d'évaluation, de quantification et de classification des textures des cristallogrammes, sur la base d'une appréciation visuelle ou d'une analyse d'images informatisées, constitue indubitablement un puissant frein à une plus large diffusion de la technique.

Une étude en cours mettant en jeu une analyse de texture d'images informatisées est présentée. L'analyse se fonde sur 256 niveaux de gris, 5 échelles de résolution ainsi que 23 paramètres d'histogrammes et de matrices de co-occurrence de niveaux de gris, dont la combinaison permet la réalisation d'une classification par analyse discriminante par incréments. Les résultats présentés sont tirés de la classification d'un ensemble de 33 images de cristallogrammes au total et d'un sous-ensemble de 21 images, tirés d'une étude expérimentale de la dégradation d'un extrait de carottes sur sept jours. Ils indiquent que le programme d'analyse d'images est capable de classer correctement les images en fonction des sept jours de dégradation. Les perspectives liées à l'application de l'analyse d'images sont brièvement commentées.

Processus de fabrication à partir de végétaux (Jean-Georges BARTH)

J-G BARTH Laboratoire de biochimie-coagulation. Centre hospitalier André BOULLOCHE 25209 MONTBELIARD.

C. BALLIVET : Institut Kepler, avenue Clémenceau 69230 St GENIS LAVAL.



La méthode de cristallisation du chlorure cuivrique a été utilisée pour distinguer qualitativement de nombreux additifs chimiques ou biologiques. Notre étude vise à trouver des conditions opératoires capables de distinguer significativement deux additifs très voisins pour permettre d'envisager l'utilisation de la méthode comme élément d'appréciation d'un processus de fabrication à partir de végétaux tels que des plantes médicinales.

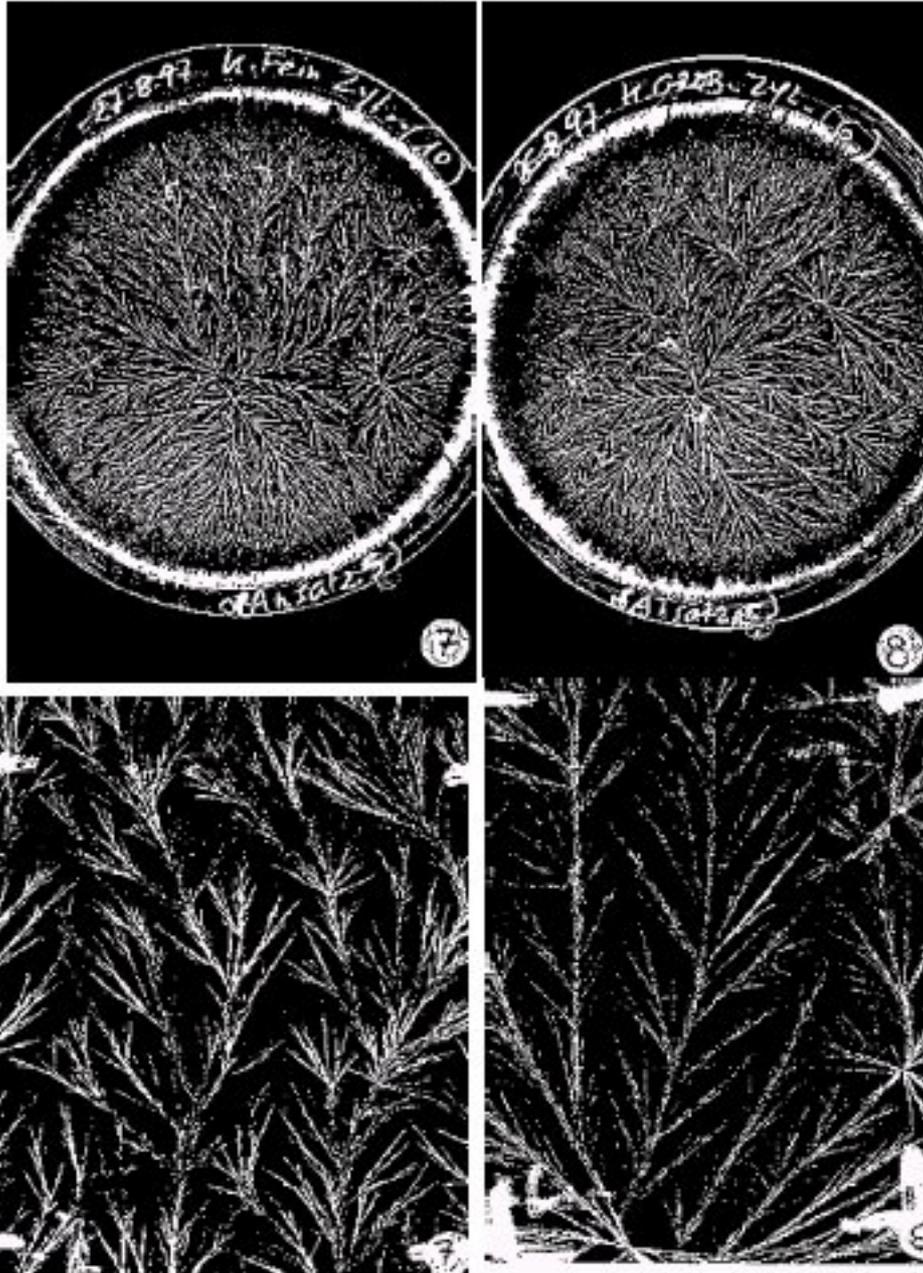
Deux décoctions hydroalcooliques (DG et DF) sont préparées à partir de la même récolte des parties souterraines de *Chamomilla recutita* (L., Rauschert). Les protocoles de fabrication ne diffèrent que par la granulométrie de la réduction de la racine. Différentes conditions de cristallisation ont été étudiées (standard, avec « manteau », conditions humides ou sèches) et la capacité discriminante de la méthode a été évaluée pour chacune d'entre elles (réussite du tri en aveugle de 72 cristallisations) en même temps qu'ont été notées les durées des phases du processus de cristallisation (durée totale, durée d'apparition du premier germe et durée de la cristallisation proprement dite).

Les conditions standard humides ou sèches conduisent à des images où structure et texture s'équilibrent. La distinction entre les images de DG et de DF est difficile et le pouvoir discriminant est moyen voire nul (74 % et 0 %).

Avec le manteau on distingue clairement deux types morphologiques où domine soit la structure (DG) soit la texture (DF). Le pouvoir discriminant est élevé (94 % et 100 % en conditions humides et sèches respectivement). Le manteau tend à homogénéiser les durées de la phase d'évaporation et de cristallisation proprement dite, que l'on opère en conditions humides ou sèches.

Conclusion : Ces expériences montrent qu'il

Images de cristallisation obtenues en conditions sèches
(HR= 70 à 73%) avec "manteau" en présence de décoction
DF(7) et de décoction DG(8)



est nécessaire de rechercher des conditions opératoires particulières pour permettre de distinguer efficacement deux additifs voisins . Le manteau permet d'obtenir des images pertinentes et des conclusions diagnostiques satisfaisantes. D'autres expériences sont nécessaires pour expliquer l'influence du manteau sur le processus de cristallisation et pour confirmer ces premiers résultats en utilisant d'autres méthodes d'analyse des cristaux.

Références : *ENQUIST M.* (1989) : Qualitätsprüfung an Gemüse durch die Kupferchlorid-Kristallisationsmethode. Forschungsring für biologisch-dynamische Wirtschaftsweise, DARMSTADT

MANDERA R., BALLIVET C., KNIJPENGA H., (1990) : Untersuchungen mit der Methode der empfindlichen Kristallisation am Bilsenkraut (*Hyoscyamus niger*). Elemente der Naturwissenschaft N° 52, p1-27.

Discussion générale

M. LUSSEYRAN

Traditionnellement, quand on se sert d'un phénomène physique dans un but métrologique, on cherche le maximum de "déterminisme", et si possible une relation linéaire, comme une droite, plus facile à utiliser. Dans le cas des cristallisations on est dans une situation complètement opposée : on utilise un phénomène physique dans ce qu'on appelle des conditions sensibles qui sont assez nettement celles d'un système dynamique non linéaire, réglé dans les conditions chaotiques. Je crois que cela peut changer le point de vue sur la mise au point de la méthode. Cette chose est tout à fait inhabituelle, il n'y a quasiment pas d'autre exemple. Il reste à préciser le cadre conceptuel. Cette remarque est complémentaire de la recherche au sujet de la structure et de la texture. Serait-il possible de trouver un moyen de caractériser le processus dynamique qui donne naissance à l'image au lieu de chercher seulement la reproductibilité finale ? Dans l'hypothèse précédente, la reproductibilité de l'image est impossible. En revanche, on devrait pouvoir y lire les conditions qui caractérisent le processus dynamique de formation de l'image. Ceci permettrait de savoir quel est le paramètre de contrôle encore inconnu qui semble lié à la vitesse d'évaporation ; par exemple, on voit que le manteau ou la cheminée jouent un rôle, ce qui permettrait de dire si la plaque peut révéler ce qu'elle a à révéler. En bref j'ai l'impression qu'il y a quelque chose à rechercher dans le cadre de ce qu'on appelle le chaos déterministe pour évaluer les bonnes conditions de l'apparition de l'image.

M. COCUBE

Vous lancez là un vaste débat. Est-ce que les derniers intervenants, ou les premiers d'ailleurs, ont une réponse à faire.

R J-G BARTH

Justement, nous nous posons la question des conditions qu'il faut réunir pour obtenir des conditions opératoires reproductibles pour une application donnée, comme l'application avec du sang humain. La question vaut, mais selon d'autres modalités, pour les applications agro-alimentaires. Je ne sais vraiment pas exactement comment envisager la question d'une façon pratique, je ne suis pas physicien et la contribution d'un physicien serait de première importance pour guider la réflexion sur la mise au point des conditions opératoires

C. BALLIVET

Je n'ai pas la réponse, et je voudrais remercier M. LUSSEYRAN d'avoir posé la question dans ces termes parce que l'expérience décrite par M. BARTH est assez étonnante. Vous avez pu constater

dans les conditions standard des images de cristallisation que l'on a l'habitude de voir et qu'on a l'habitude de trouver réussies du point de vue de leur sensibilité. L'idée d'avoir à essayer ce nouveau dispositif est stimulante mais les physiciens sont mieux en mesure de nous donner les concepts qu'il faut pour travailler. L'intérêt de ce colloque, et c'est un très grand progrès, est d'avoir mis ensemble plusieurs disciplines parce que la conceptualisation de l'une peut beaucoup aider l'autre.

M. COCUBE

Madame, vous anticipez sur la conclusion. C'est exactement ce que je comptais dire. Aujourd'hui, on a fait quelque chose de très important. Outre le fait de mettre en contact des gens très éloignés dans l'espace comme Mme Ballivet, M Shibata ,... nous avons réussi à rassembler sur un thème donné des gens de disciplines fort différentes. Et le débat est d'une extrême richesse. C'est la première étape. Pour le prochain colloque des cristallisations (de l'an 2000 ?), il faudrait ajouter encore d'autres spécialistes, en images virtuelles, en physique, en cristallographie, etc. La remarque de Mme Ballivet est tout à fait pertinente. Il y a eu au début de l'année, un numéro spécial de "La Recherche" sur les formes. Il est absolument étonnant de voir ce qui peut se passer dans le développement depuis l'embryon jusqu'aux organes matures, par exemple la genèse de la forme de la corne de bœuf... Je pense qu'en matière de cristallisation, il faut arriver à une approche de cet ordre, je ne sais pas si c'est une approche chaotique ou pas, mais on a probablement besoin d'un outil conceptuel.

M Lusseyran, avez-vous des éléments de réponse. Vous avez employé le mot chaos. Que voulez-vous dire exactement et surtout comment utiliser cette notion dans le domaine qui nous intéresse ?

M. LUSSEYRAN

Les pistes ne sont pas très simples. J'ai été intéressé par les tentatives pour quantifier le décours temporel de la cristallisation. Cela voudrait dire utiliser, du moins dans un premier temps, la phase de formation et essayer de la caractériser au sens de la dynamique, de trouver les moyens de créer un portrait de phase et de le caractériser, quitte après à remonter à l'image formée. Ce n'est pas facile, la piste n'est pas simple, parce qu'il faut avoir normalement des séries temporelles très longues pour pouvoir faire ce genre d'étude. Or le système s'y prête mal. Je ne vois pas dans l'instant une façon pratique de démarrer ; il y a une réflexion à mener, pour être à même de tout déduire de l'image finale de cristallisation.

M. COCUBE

Je reviens à ma référence de "La Recherche". On arrive à expliquer beaucoup de choses, à trouver le comment, mais le pourquoi reste malheureusement une interrogation majeure. Je crois que dans notre domaine de la cristallisation il en va de même.

M CHAMBOLLE

Je voudrais faire une remarque sur l'intérêt de telles méthodes appliquées à l'agro-alimentaire, l'agronomie, etc. Il est clair que, aussi bien les chercheurs que les praticiens, les responsables de la qualité des produits, qu'ils soient producteurs ou transformateurs, sont intéressés par des méthodes globales qui donnent un résultat discriminant même si l'on ne connaît pas exactement les mécanismes qui en sont à l'origine. Cependant, il faut bien voir que tout ce qui touche à la répétabilité et à la reproductibilité est essentiel pour que ces méthodes puissent déboucher. Les chercheurs ont besoin d'avoir des méthodes comparables d'un laboratoire à l'autre comme tous ceux qui procèdent à des analyses ou à des tests pour caractériser les produits. Je suis tout à fait profane dans le domaine. L'impression que j'ai eue aujourd'hui c'est que les questions de reproductibilité et de répétabilité sont en tête, elles sont cruciales pour ces méthodes. Elles sont également à la base des travaux que nous avons vus pour le "design" des équipements, la mécanisation, la robotisation, etc. Cela étant, cet aspect est un peu secondaire par rapport aux préoccupations actuelles, qui sont de relier l'observation de ces phénomènes à d'autres phénomènes, biologiques notamment. Je voudrais attirer l'attention sur la vulgarisation de ce genre de méthode. Il est clair que, au stade actuel, ce sont des méthodes dont la répétabilité et la reproductibilité sont faibles ; la vulgarisation doit en être faite avec la plus grande prudence. Or ce sont des méthodes qui sont extrêmement séduisantes parce qu'elles ont une apparence de simplicité - je dis bien une apparence - et qu'elles se traduisent par des résultats très discriminants, mais il faudrait éviter que ces méthodes donnent lieu à des engouements de la part de gens qui y verraient des applications immédiates, et s'engageraient dans des voies périlleuses pour eux-mêmes et disons pour la "cause" qu'ils veulent défendre.

M. COCUBE

Vous avez tout à fait raison. Cela étant, le sujet dont nous avons parlé aujourd'hui n'est pas sur la place publique, il s'en faut de beaucoup. On parle d'un certain nombre de méthodes alternatives mais en matière de cristallisations sensibles je ne connais pas de médias qui s'y soient intéressés.

En ce qui concerne la reproductibilité, la répétabilité j'ai le même sentiment que vous, c'est quelque chose d'absolument essentiel et, d'une façon inconsciente, les gens qui ont des résultats à présenter, obtenus au terme de beaucoup d'efforts, beaucoup de recherches par "essais et erreurs" ont tendance à oublier toutes les difficultés quand ils arrivent à un résultat. Dans ce domaine, l'exigence scientifique est encore plus évidente que dans d'autres. Il faut être absolument rigoureux pour pouvoir dire des choses qui ne soient pas sujettes à caution. C'est un des enseignements majeurs de la journée, on ne saurait trop faire attention à l'établissement de protocoles rigoureux et à leur respect.

On n'évite pas toutes les difficultés d'ailleurs. M. BARTH nous a montré tout à l'heure que deux produits différents, avec deux concentrations différentes, pouvaient avoir les mêmes cristallisations. C'est un problème. Ceci ne rejoint-il pas d'ailleurs la notion de classe d'universalité évoquée par M. FLEURY en début de journée ?

INTERVENTION DE M. ANDERSEN

Dans les sciences nous avons à faire face au challenge de comprendre les phénomènes de la nature comme des “parties” détaillées et comme des entités complexes ou “totalités”. Sur le premier point nous avons fait de grandes avancées en analysant les minéraux, les composés chimiques et même les atomes. Et dans de nombreux cas des modèles informatiques peuvent fournir une information valable sur le comportement de systèmes complexes.

Cependant sur le sujet de la “totalité” complexe des organismes vivants nous sommes encore dans la même situation que l’obèse qui désirait jouer au golf. Son problème était en ceci : lorsqu’il pouvait voir la balle il ne pouvait l’atteindre et lorsqu’il pouvait l’atteindre il ne la voyait pas.

En d’autres termes : quand nous, en tant que scientifiques, nous sommes confrontés à des organismes vivants, nous n’avons pas à notre disposition des méthodes standardisées et des concepts qui nous permettent d’atteindre l’organisme vivant dans sa globalité intégrée. Autrement dit quand nous sommes capables de l’atteindre” (au moyen de méthodes analytiques), nous ne pouvons plus “voir” l’organisme vivant car la “totalité” unique s’est désintégrée et a disparu.

Aussi, nous avons besoin de méthodes et de concepts qui d’un côté nous fournissent la précision des méthodes analytiques mais qui simultanément d’un autre côté nous permettent de voir, d’approcher et de comprendre l’organisme vivant d’une façon plus globale.

Une façon de procéder ainsi est l’approche morphologique ; la bio- cristallisation est une telle méthode, susceptible d’apporter une contribution précieuse. Naturellement ceci est un chemin difficile car des formes complexes apparaissent beaucoup moins “conceptualisables” et quantifiables que des résultats numériques. Mais les formes offrent une information unique sur différents aspects des organismes vivants inaccessibles par l’approche analytique.

CONCLUSION (Marcel COCUBE¹)

1) M. Cocude Président de la CORSS (Commission des Recherches Scientifiques et Techniques sur la Sécurité et la Santé dans les Industries extractives).



Au terme d'une journée qui suscite en chacun de nous réactions et interrogations, je voudrais, pour ma part, noter - en guise de conclusion - quelques points qui me paraissent importants.

*** Un fait majeur concerne la confrontation des praticiens et des théoriciens** sur une méthode - la cristallisation de chlorure cuivrique avec additifs - qui, si elle est utilisée depuis des décennies avec certains résultats, est à la recherche de sa validation.

Les praticiens trouvent dans l'approche scientifique une légitimation de leur démarche et en même temps matière à réflexion sur les fondements théoriques de leur travail. Il devrait en résulter une meilleure adéquation des méthodes aux objectifs.

Les théoriciens, de leur côté, ont beaucoup à gagner du questionnement des praticiens sur leur façon de décoder les problèmes concrets qui se trouvent posés.

*** Une deuxième réflexion portera sur l'indispensable amélioration des outils et des techniques.**

- Les outils intellectuels : il est souhaitable d'introduire dans le domaine des cristallisations sensibles des concepts tels que classe d'universalité ou chaos déterministe développés depuis quelques années par les physiciens.

- Les matériels et les méthodes ensuite : la technologie met en effet à la disposition des chercheurs des moyens sans cesse perfectionnés. Il s'agit d'observer (avec des méthodes de plus en plus automatisées) le phénomène lui-même de cristallisation dans ses différents aspects statique et dynamique, la nature et la géométrie des dépôts et leur relation avec les dépôts antérieurs, le rôle du cuivre de la solution et celui des ajouts, etc. Cette approche ne saurait ignorer la tridimensionnalité du phénomène.

*** Une troisième réflexion portera sur la relation cause-effet.**

On a pu voir l'impact sur la cristallisation de différents additifs simples présents dans le sang ou les sucres végétaux. Dans cet ordre d'idées, les travaux de Leray sont toujours d'actualité et leur continuation hautement souhaitable.

Des études mettant en évidence l'impact de constituants divers, pris séparément puis par 2 ou 3, ne permettraient-elles pas de fournir des référentiels de cristallisation - et leur indispensable intervalle de confiance ?

Ceci rappelle l'importance des modes opératoires (conditions climatiques spécifiques, qualité des supports, etc.) et le respect de protocoles stricts standardisés.

*** Le dernier point portera sur les applications.**

La recherche de l'effet sur la cristallisation de tel ou tel ajout (ou ensemble d'ajouts) est une démarche légitime pour arriver inversement à détecter la présence de tel(s) ou tel(s) additif(s) au vu de la cristallisation. S'agissant de porter un jugement sur la "qualité" d'un matériau biologique, on se heurte d'emblée à l'extraordinaire complexité d'un sang ou d'un suc végétal qui rend très difficile, voire impossible, leur description complète. Nous sommes bien en peine de déterminer lequel (ou lesquels) de ces composants porte l'information pertinente même si nous pouvons légitimement, dans le cas du sang, attribuer aux protéines un rôle très important.

Au demeurant, y a-t-il des éléments pertinents ? N'est-ce pas plutôt l'ensemble de ces éléments qui porte l'information comme leur présence simultanée et - ou - leurs proportions relatives ?

Ceci fonde la recherche de l'utilisation de la méthode en tant que méthode globale. Même si l'esprit humain n'est pleinement satisfait que lorsqu'il dispose d'une explication rationnelle des phénomènes observés, la connaissance des mécanismes ne constitue pas un préalable à l'utilisation de la méthode.

Le stade actuel de nos connaissances nous permet d'énoncer certaines propositions.

- Dans le domaine médical, on peut raisonnablement avancer l'hypothèse que la cristallisation, sans être prédictive, permettrait la mise en évidence du risque d'apparition d'une pathologie nouvelle, de récurrence d'une pathologie ancienne ou d'évolution d'une pathologie chronique. Cette hypothèse doit-être validée

Des expérimentations ont été proposées, qui s'inscrivent parfaitement dans la suite des études menées dans les années 1990. A l'époque, les auteurs avaient souligné qu'elles appelaient des développements par un suivi cristallographique et clinique des sujets. Les difficultés ne sont pas négligeables puisque, pendant toute la durée de l'expérimentation, de nombreux facteurs exogènes peuvent intervenir et notamment les thérapeutiques médicamenteuses éventuellement mises en place.

- Dans le domaine agro-alimentaire, des pistes sont tracées. Ce champ mérite d'autant plus d'être exploré que le public s'intéresse chaque jour davantage à la qualité de ce qu'il mange, conscient de l'impact sur sa santé.

Chacun sent bien que ce champ d'investigation et les validations scientifiques afférentes en sont à leur début ; d'importantes recherches s'avèrent nécessaires avant une utilisation banalisée.