

SL Dr. Liviu Tămaş tamas.liviu@umft.ro et tliviu33@yahoo.com

Toutes les questions seront envoyées à SL Dr. Liviu Tămaş aux les adresses de email fournis (**IMPORTANT** – les questions seront envoyées simultanément aux les deux adresses de email fournis et pas seulement a une !!!)

Détermination d'acide urique

Introduction

Dans le corps, l'acide urique provient du catabolisme des acides nucléiques obtenus à partir d'alimentation ou à partir de l'apoptose du matériel cellulaire du corps. En fait, l'acide urique est le produit final du catabolisme des nucléotides puriques chez l'homme et les primats.

D'autres animaux ont l'allantoïne comme produit final, dû à la présence d'une enzyme spéciale, l'uricase, qui peut cataboliser l'hétérocycle hexagonal de l'acide urique.

Hyperuricemia (niveau acide urique élevé de sang) est provoqué par une variété des maladies. Celles-ci incluent une synthèse plus grande d'acide urique ou une excrétion diminuée d'acide urique.

La goutte est une maladie résultant de la surproduction ou de la sous-excrétion de l'acide urique. Elle est caractérisée par le dépôt des cristaux d'urate dans les articulations et les tissus péri-articulaires qui causent l'inflammation.

La conservation rénale est associée à l'insuffisance rénale et à la toxicité provoquée par le plomb et l'alcool. Elle peut également être provoquée par l'administration des salicylates et des diurétiques.

Hyperuricemia apparaît également dans la leucémie, le myeloma, le lymphome de Hodgkin, la mononucléose infectieuse, le psoriasis, les intoxications de Pb et Hg, les brûlures étendues, etc.

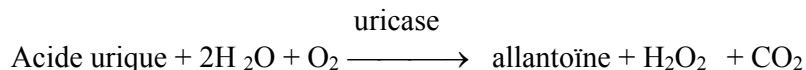
Hypouricemia (niveau d'acide urique diminué le sang) n'est pas commun. Hypouricemia peut se produire dans des maladies hépatocellulaires graves ou quand la réabsorption tubulaire rénale d'acide urique est altérée, dans le défaut de la xanthine oxydase. De temps en temps, c'est le résultat de traitement pour le hyperuricemia.

Principe

L'acide urique est déterminé par la méthode de l'acide phosphotungstique ou par une méthode enzymatique en utilisant l'uricase.

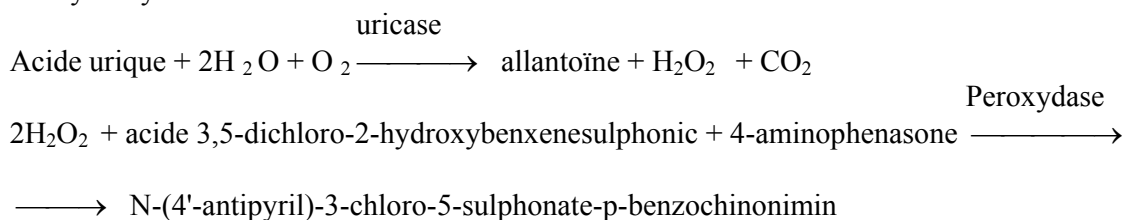
a) Méthode enzymatique

L'acide urique est oxydé au peroxyde d'hydrogène et allantoïne en présence de l'eau et du oxygène selon la formule :



Cette réaction est surveillée par deux méthodes :

- Un est basé sur la diminution de l'absorption à 293 nm donné par l'acide urique.
- Dans l'autre méthode, le peroxyde d'hydrogène qui est produit est utilisé dans une réaction couplée catalysée par la peroxydase pour produire un changement de couleur d'un indicateur redox tel que l'o-dianisidine, la toluidine, l'hydrazone de méthylbenzothiazolinone, ou le dichlorohydroxybenzène.



Réactifs

1. Solution tampon : solution tampon de phosphate, pH 7 - 50 mM ; acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulphonic 4 mM.
2. Réactif enzymatique : 4-aminophenazone - 0.3 mM ; peroxydase - 1000 U/l ; uricase - 200 U/l tous dans la solution tampon (1). La stabilité de la solution est de 21 jours à 2-8°C et 5 jours à 15-25°C, à l'obscurité.
3. Solution étalon d'acide urique : 10 mg%

Procédé

Les réactifs sont introduits dans trois tubes à la pipette comme suit :

Réactifs (µl)	Échantillon	Etalon	Témoin
Sérum	20	-	-
Acide urique étalon	-	20	-
Réactif enzymatique	1000	1000	1000

Les tubes sont mélangés et incubés 15 minutes à 20 - 25°C. L'échantillon et les absorbances du standard sont lus à 520 nm, dans un délai de 30 minutes, calibrant le spectrophotomètre avec le témoin.

Calcul

$$\text{mg \% acide urique} = A_{\text{Ech}} (A \text{ d'échantillon}) / A_{\text{Et}} (A \text{ d'étalon}) \times 10$$

b) Méthode colorimétrique

Principe

C'est une méthode basée sur le caractère réducteur de l'acide urique. L'acide urique réduit l'acide phosphotungstique, dans le milieu alcalin, formant un complexe coloré en bleu. L'intensité de couleur est directement proportionnelle à la concentration acide urique dans l'échantillon analysé. L'acide ascorbique s'y mêle dans la réaction mais il est éliminé par le pH alcalin (10-11) de l'amortisseur.

Réactifs

1. Solution de déprotéinisation : sulfate de sodium anhydre - 150g ; 0.1N acide sulfurique - 1000ml
2. Réactif phosphotungstique : tungstate de sodium - 50g ; acide phosphorique de 85% - 40ml ; eau distillée - 400 ml. Le mélange est bouilli au reflux pendant 4 heures. Si la solution est verte, 1-2 gouttes du brome sont ajoutées et la solution est bouillie encore pendant quelques minutes. Après refroidissement, la solution est diluée à 500 ml avec de l'eau distillée.
3. Solution tampon de glycine, pH = 12.5 : Glycine 3g et NaOH 0.1N - 100 ml.
4. Solution étalon stock de l'acide urique - 100 mg% : 100 l'acide urique sont dissous en 60 ml eau bidistillée à 60°C. La solution est refroidie et 2.5 ml de formaldéhyde 40% et 0.3 ml d'acide acétique sont ajoutés, que la solution est diluée à 100 ml avec d'eau bidistillée.
5. Solution étalon de l'acide urique - 5 mg% ; est obtenu en diluant la solution étalon stock.

Collection d'échantillon

Le sérum ou le plasma peut être employé. Si le plasma est employé, le sang devrait être prélevé en EDTA et pas avec de l'héparine.

Mode opératoire

1. Déprotéinisation de sérum

0.5 ml de sérum sont mis dans un tube à essai ; 4.5 ml de solution de déprotéinisation sont ajoutés et le mélange est bouilli 15 minutes sur le bain d'eau, secouant de temps en temps. La solution chaude obtenue est filtrée sur un filtre sec dans un autre tube à essai.

2. Coloration

Les réactifs sont introduits à la pipette dans des tubes à essai comme suit :

Réactifs, ml	Échantillon	Etalon	Témoin
Filtrat déprotéinisé	2.0	-	-
Solution de déprotéinisation	-	1.8	1.8
Solution étalon	-	0.2	-
Eau distillée	-	-	0.2
Solution tampon glycine	0.5	0.5	0.5

Le mélange est laissé pendant 5 minutes à la température ambiante, que s'ajoutent :

Réactif phosphotungstique	0.1	0.1	0.1
---------------------------	-----	-----	-----

Les solutions sont bien mélangées et laissées à la température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance de l'échantillon et du standard est lu à 710 nm, vis-à-vis de témoin.

Calcul

$$\text{mg \% acide urique} = \text{mg \% acide urique} = A_{\text{Ech}} (A \text{ de échantillon}) / A_{\text{Et}} (E \text{ d'étalon}) \times 5$$

Valeurs normales

Adultes : sérum de 1 - 7 mg/100ml

Enfants : sérum de 1 - 3 mg/100ml

Hyperuricemia

L'acide urique est une molécule très peu soluble qui provient du catabolisme des bases puriques (adénine, xanthine, guanine). Sa molécule se présente sous la forme d'une trihydroxypurine. Ses OH ont un pK d'ionisation bas, on trouve donc la molécule sous une forme dissociée à pH physiologique.

Il peut se former des précipités d'urate mono- ou di-sodique.

Devenir : l'acide urique subit une filtration glomérulaire, une réabsorption totale et une sécrétion par les cellules de l'arbre urinaire.

Son dosage est facile dans le sérum veineux. Ce dosage est très courant et fait partie du bilan biologique quotidien.

Sa forme circulante est : acide urique + urate monosodique (qui est de couleur rouge), à la limite de la saturation.

Son taux est de 1 – 7 mg/dl. Ce taux varie selon les apports diététiques.

Il peut y avoir une précipitation de l'acide urique et d'urates :

- dans les articulations, on appelle alors ces précipités des tophi,
- et dans les voies urinaires, on parle alors de lithiase. On parle de cristaux d'urates.

Pathologie

1) La goutte commune

Elle est très fréquente. Survient à cause de la précipitation de cristaux d'urates dans les articulations et est liée à un défaut de catabolisme des purines (accélération) et à une hyperproduction également. Il y a hypersynthèse de l'acide urique et défaut d'élimination rénale.

Les médicaments utilisés contre la crise de goutte augmentent donc l'élimination rénale et freinent la production.

Elle se traduit par des crises douloureuses avec des articulations inflammatoires, et notamment un gros orteil hyperalgique. Le patient, typiquement, ne supporte pas le drap, il laisse pendre sa jambe hors du lit, ce qui peut être agréable l'été, mais en gêne plus d'un l'hiver. Cela touche donc essentiellement les articulations métatarso-phalangiennes. On parle d'arthropathie inflammatoire et il faut faire attention au passage à la chronicité.

Elle apparaît pour une uricémie supérieure à 7 mg/dl. Son dosage est toutefois peu fiable. Si l'on est en phase critique d'accumulation d'acide urique avec uricémie importante, on a une compensation vers le bas par précipitation. Ainsi le dosage est faussé par cet effet de diminution de l'uricémie qui s'est transformée en cristaux.

2) La goutte par enzymopathie héréditaire

Elle touche le gène de l'HGPRT (Hypoxanthine Guanine PhosphoRibosyl Transférase) qui se trouve sur le chromosome X, ainsi, il s'agit d'une affection récessive touchant le garçon essentiellement. Elle est due à un déficit initial en HGPRT qui est une enzyme de recyclage des bases puriques, et qui sert à refaire des nucléotides à base purique. Elle est peu fréquente: touche 1/10000 personne.

Ce déficit en HGPRT est responsable d'une néosynthèse emballée des bases puriques.

Résultat : il y a des dépôts d'acide urique dans tous les tissus, et surtout au système nerveux central, car il est très dépendant de la voie de recyclage. On aura alors un retard psychomoteur et une affection neurologique possible. Le diagnostic est fait par le dosage de l'HGPRT dans les leucocytes.

3) Autres causes d'hyperuricémie

Elles sont plus fréquentes. Sont dues à des erreurs diététiques qu'il faut traquer, et notamment toute alimentation hyperprotéinée, source d'acide urique : excès d'abats, de charcuterie, de gibier.

Peuvent être également dues à une insuffisance rénale, et dans ce cas, il y aura d'autres paramètres qui nous permettront de la suivre. Elles peuvent survenir suite à un hypercatabolisme cellulaire, notamment au cours des hémopathies.

Au cours d'hémopathies malignes, des polyglobulies, d'hyperleucocytose, il y aura production d'acide urique augmentée par turnover très important des érythrocytes, et même des érythroblastes.

Les traitements cytolytiques (chimiothérapies) nécessitent une surveillance régulière de l'uricémie.

En chimiothérapie, pour avoir un reflet de la lyse cellulaire, on effectue un dosage de l'acide urique, ce qui est un reflet de l'activité lytique des chimiothérapies.

Enfin elles peuvent être la cause de l'acide lactique qui inhibe l'élimination rénale d'acide urique.

4) Complications des hyperuricémies

Les complications vasculaires sont : artérites, atteintes coronaires, AVC, par dépôts inframicroscopique, ce qui entraîne une rigidification artérielle. Les complications rénales sont essentiellement caractérisées par une lithiase des voies excrétrices, ce qui entraîne des coliques néphrétiques. C'est la principale complication. Si on ne fait rien à ce stade là, il y aura évolution vers une néphropathie urique et insuffisance rénale progressive.

On utilisera des médicaments urico-freinateurs et des médicaments urico-éliminateurs.