

Faculté de Pharmacie - Section française
IIIème année

La correspondance avec: **Asist. dr. Adrian Mihala - mihala.adrian@umft.ro** et
Asist. drd. Aimée Chis - chis.aimée@umft.ro

T.P.6. DETERMINATION D'ACIDE URIQUE

Introduction

Dans le corps, l'acide urique provient du catabolisme des acides nucléiques provenant d'alimentation ou 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 le hétérocycle hexagonal de l'acide urique.

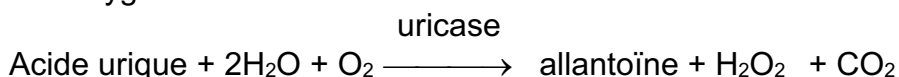
L'acide urique est produit principalement dans le foie des purines endogènes et exogènes et est éliminé par sécrétion tubulaire rénale. La concentration normale de l'acide urique dans le sérum est 1-7 mg/100 ml, ce qui correspond à une quantité totale d'urate dans le corps de 1 gramme. Pathologiquement, la réserve d'urate peut être augmentée (25-30 g) selon un défaut dans l'élimination rénale (70-80%) ou en raison d'une production élevée (20%), qui se traduit par une augmentation de la concentration d'acide urique sérique ; ceci est peu soluble, il peut être déposé dans les tissus mous, ce qui provoque une maladie appelée goutte.

Principe

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

a) **Méthode enzymatique**

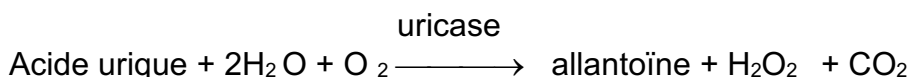
L'acide urique est oxydé au peroxyde d'hydrogène et allantoïne en présence de l'eau et du oxygène selon la :



L'enzyme qui catalyse la réaction est l'uricase.

Cette réaction est surveillée par deux méthodes :

- Une est basée sur la diminution de l'absorption à 293 nm, donnée 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'hydrasone de méthylbenzothiazolinone, ou le dichlorohydroxybenzène.



Les méthodes enzymatiques sont caractérisées par spécificité et sensibilité.

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%

Procédure

Les réactifs sont introduits dans trois tubes comme suit :

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

Les tubes sont mélangés et incubés 15 minutes à 20 - 25°C. Les absorbances de l'échantillon (A_E) et de l'étalon (A_{ET}) sont lus à 520 nm, dans un délai de 30 minutes, en calibrant le spectrophotomètre avec le témoin.

Calcul

$$\text{mg \% acide urique} = (A_E / A_{ET}) \times 10$$

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 un milieu alcalin, formant un complexe coloré en bleu. L'intensité de couleur est directement proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon analysé. L'acide ascorbique s'y mêle dans cette réaction mais il est éliminé par le pH alcalin (10-11) du milieu de réaction.

Réactifs

1. Solution de déprotéinisation : sulfate de sodium anhydre – 150 g sont dissolus en 1000 ml acide sulfurique 0,1N.
2. Réactif phosphotungstique : tungstate de sodium – 50 g ; acide phosphorique de 85% - 40 ml ; 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 : 3 g glycine sont dissous en 100 ml NaOH 0,1N.
4. Solution étalon stock de l'acide urique - 100 mg% : 100 mg d'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 ; après ça, la solution est diluée à 100 ml avec de l'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 dans un 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. Réaction de couleur

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

Réactifs, ml	Échantillon	Etalon	Blanc
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 ; après ça on ajoute :			
Réactif phosphotungstique	0,1	0,1	0,1

Les tubes sont secoués et laissés à la température ambiante pendant 15 minutes. Les absorbances de l'échantillon et du standard sont lues à 710 nm, en calibrant le spectrophotomètre avec le témoin.

Calcul

$$\text{mg\% acide urique} = (A_E / A_{ET}) \times 5$$

Valeurs normales

Adultes : sérum de 1 - 7 mg/100 ml

Enfants : sérum de 1 - 3 mg/100 ml

Pathologie

Hyperuricémie (niveau d'acide urique élevé dans le sang) est provoqué par une variété des maladies. Celles-ci incluent une synthèse accrue d'acide urique ou une excrétion rénale diminuée d'acide urique.

La goutte est une maladie résultant de la surproduction ou du 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.

L'hyperuricémie apparaît également dans la leucémie, le myélome, le lymphome de Hodgkin, la mononucléose infectieuse, le psoriasis, les intoxications de Pb et Hg, les brûlures étendues, etc.

Hypouricémie (niveau d'acide urique diminué dans le sang) n'est pas commun. L'hypouricémie 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. Elle peut être, aussi, le résultat du traitement pour l'hyperuricémie.