



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 14292

**To cite this version :**

Anne, Laurène. *Variabilité inter- et intra- laboratoire de la mesure du rapport protéines sur créatinine* . Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 91 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

---

# VARIABILITE INTER- ET INTRA- LABORATOIRE DE LA MESURE DU RAPPORT PROTEINES SUR CREATININE

---

THESE

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

**ANNE Laurène**

Née, le 12 juillet 1984 à Lille (59)

---

**Directeur de thèse : M. Hervé LEFEBVRE**

---

**JURY**

**PRESIDENT :**  
**M. Éric OSWALD**

**Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE**

**ASSESEURS :**  
**M. Hervé LEFEBVRE**  
**M. Didier CONCORDET**

**Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE**  
**Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE**



Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : Mme Isabelle CHMITELIN

**PROFESSEURS CLASSE  
EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°  
CLASSE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2°  
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*

Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*

M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*

M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*

M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

### **PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*

M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*

Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

<b>MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)</b>
--

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*

Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*

M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*

M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*

Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*

Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*

M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## **MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*  
M. **HERRY Vincent**, *Pathologie des ruminants*

<b>ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS</b>
---

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*



## **A mon président de thèse**

Monsieur le Professeur Eric OSWALD

*Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse*

Hommages respectueux

## **A mon jury de thèse**

Monsieur le Professeur Hervé LEFEBVRE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Physiologie

*Pour son écoute, ses conseils, sa patience qui m'ont permis de mettre en place et de mener à bien mon étude. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer toutes les bases de la discipline, ce qui m'a permis de comprendre et de saisir l'intérêt de cette étude dans la pratique vétérinaire.*

Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance

Monsieur le Professeur Didier CONCORDET  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Statistiques

*Pour son aide et ses explications quant à la partie statistique de l'étude.*

Sincères remerciements

**A mes parents et toute ma famille.**

Pour avoir tout fait pour m'aider à devenir vétérinaire.

**A mes amis drouais** (Céline, Bénédicte, Caroline, Marion, Sandrine et Myguel).

Bravo pour m'avoir supportée et écoutée.

**Au Dr. J. Bourjat, son épouse, Céline et Marion du Cabinet Vétérinaire Plein Sud**

Pour leur présence à mes côtés, leur aide, leur écoute, et tout ce qu'ils m'ont appris.

**Aux Dr. P. Chaudenson et G. Renevier.**

Pour m'avoir fait découvrir ce métier passionnant et m'avoir accompagnée tout au long de mes études.

**A mes amies toulousaines** (Marina et Mirentxu).

Pour tous les bons moments partagés ensemble à l'école

**A Benjamin Taillade.**

Merci pour son aide pour la réalisation de cette étude.

**A Héloïse Phillippon**, étudiante en cinquième année de biostatistiques à l'INSA de Lyon. Pour avoir réalisé toute la partie statistique, j'ai apprécié son professionnalisme et sa patience.

**Aux membres de l'équipe de l'unité pédagogique de physiologie.**

Toujours présents pour m'aider, et répondre à mes questions sur de nombreux aspects pratiques de mon stage.

**Au Pr. J-P. Braun.**

Pour toutes les informations concernant les dosages, et pour avoir pris le temps de relire mon protocole expérimental afin d'y traquer mes erreurs.

**A Anne, Bénédicte et Caroline,**

Merci infiniment pour votre aide dans la rédaction de cette thèse.

# Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	11
<i>Liste des tableaux et des illustrations</i>	12
<i>Liste des illustrations</i>	13
<b><i>Introduction</i></b>	15
<b>Partie bibliographie : le rapport protéines sur créatinine urinaires</b>	17
I – Définitions	19
II – Dosages des protéines et de la créatinine dans les urines	21
III – La protéinurie chez le chien	33
IV – Utilisation du rapport protéines sur créatinine urinaires	37
<b>Partie expérimentale : étude de la variabilité inter- et intra-laboratoire de la mesure du rapport protéines sur créatinine urinaires</b>	41
I – Problématique et objectifs	43
II – Matériels et méthodes	43
III – Résultats	52
<b><i>Discussion</i></b>	71
<b><i>Conclusions</i></b>	73
<i>Bibliographie</i>	75
<i>Table des matières</i>	81
<i>Annexes</i>	85



## **Liste des abréviations**

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CV : Coefficient de Variation

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

DU : Densité urinaire

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

HRE : High Resolution Electrophoresis, électrophorèse haute résolution en français

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

IRIS : International Renal Interest Society

RPCU : Rapport Protéines sur Créatinine Urinaires

SD : Standard Deviation, écart type en français

SDS-AGE : Sodium Dodecyl-Sulfate Agarose Gel Electrophoresis, électrophorèse sur gel d'agarose en français

## **Liste des tableaux**

Tableau 1. Caractéristiques métrologiques, coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité des différentes méthodes de dosages des protéines urinaires (données chez l'homme).	24
Tableau 2. Excrétion protéique journalière chez le chien cliniquement sain, selon différentes études.	30
Tableau 3. Evaluation du RPCU en fonction des résultats du dosage semi-quantitatif des protéines avec une bandelette urinaire et de la densité urinaire.	35
Tableau 4. Classification et recommandations de l'IRIS pour l'évolution de l'IRC chez le chien.	36
Tableau 5. Caractéristiques des méthodes de dosage de la créatinine des différents laboratoires : méthode, technique, contrôle qualité et nombre d'échantillons dosés par jour.	45
Tableau 6. Caractéristiques des méthodes de dosage des protéines des différents laboratoires : méthode, technique, contrôle qualité et nombre d'échantillons dosés par jour.	45
Tableau 7. Ecart-type et moyennes des RPCU.	52
Tableau 8. Nombre d'échantillons non protéinuriques, protéinuriques et douteux, en fonction des laboratoires.	58
Tableau 9. Valeurs des coefficients de variation intra-laboratoire.	68

## Liste des illustrations

Figure 1. Complexe entre les ions $\text{Cu}^{2+}$ et les liaisons peptidiques.	14
Figure 2. Complexe Rouge de Pyrogallol – Molybdate.	15
Figure 3. Bleu de Coomassie.	16
Figure 4. Violet de Pyrocatechol.	17
Figure 5. Dégradation de la créatinine en créatine, par l'action de la créatinine aminohydrolase.	21
Figure 6. Dégradation de la créatine en créatine phosphate et en sarcosine, par l'action de la créatine kinase et de la créatinase.	21
Figure 7. Etapes de préparation des échantillons d'urines à analyser.	37
Figure 8. Représentation en "boîte à moustaches" des valeurs du RPCU pour chaque laboratoire.	46
Figure 9. Représentation des dosages de RPCU pour chaque chien et chaque laboratoire.	47
Figure 10. Représentation en "boîte à moustaches" des valeurs de créatinine pour chaque laboratoire.	49
Figure 11. Valeur de la concentration urinaire de créatinine par laboratoire, en fonction du chien et de la dilution.	50
Figure 12. Représentation en "boîte à moustaches" des concentrations en protéines pour chaque laboratoire.	51
Figure 13. Valeur de la concentration urinaire de protéines par laboratoire, en fonction du chien et de la dilution.	52
Figure 14. Résultats de l'ANOVA pour le laboratoire A.	56
Figure 15. Résultats de l'ANOVA pour le laboratoire B.	57
Figure 16. Résultats de l'ANOVA pour le laboratoire C.	58
Figure 17. Résultats de l'ANOVA pour le laboratoire D.	60
Figure 18. Résultats de l'ANOVA pour le laboratoire E.	60
Figure 19. Données des moyennes du RPCU par laboratoire et par chien, et résultats du test de Quade.	62
Figure 20. Résultats du modèle à effet mixte pour l'étude de la variabilité inter-laboratoire.	64
Figure 21. Données des moyennes du dosage de la créatinine par laboratoire et par chien et résultat du test de Quade.	65
Figure 22. Données des moyennes du dosage des protéines par laboratoire et par chien et résultat du test de Quade.	66



## Introduction

Du fait du vieillissement de la population des chiens de compagnie, les maladies rénales sont de plus en plus fréquentes en pratique vétérinaire courante<sup>29</sup> (insuffisance rénale chronique (IRC) ou tumeur rénale, par exemple). Ces maladies évoluent inexorablement vers la mort du chien si elles ne sont pas prises en charge rapidement. Il est important de pouvoir les détecter au plus tôt et de les traiter le plus précocement possible, afin de ralentir ou d'arrêter leur évolution et de guérir le chien, ou, à défaut, d'améliorer sa qualité de vie.

Dans ce contexte, la protéinurie est une variable essentielle en biologie médicale vétérinaire<sup>19, 21, 29, 30</sup>. La protéinurie peut être physiologique ou pathologique et désigne la présence dans les urines de protéines, quelles qu'elles soient<sup>1, 30</sup>. La présence persistante de protéines, associée à une absence de culot urinaire, est toujours le signe d'une maladie rénale<sup>30</sup>. La protéinurie est un marqueur incontournable<sup>19, 23, 30</sup> en néphrologie dans la détection de ces maladies et notamment des atteintes glomérulaires<sup>5, 43, 51</sup>. Elle permet non seulement une détection précoce<sup>29</sup>, mais aussi le suivi de l'évolution de ces maladies<sup>1, 18, 21, 23, 30</sup> (exemple : IRC).

Ainsi, tant dans un cadre thérapeutique que de dépistage, la protéinurie doit être régulièrement surveillée. Cette surveillance est fréquemment effectuée grâce à des bandelettes réactives ou par une réaction de Heller (précipitation des protéines en milieu acide)<sup>30, 52</sup>. Ces deux méthodes sont cependant uniquement semi-quantitatives. Seul le dosage de la concentration des protéines dans les urines prélevées sur 24 heures ou le rapport protéines sur créatinine urinaires (RPCU) permettent une quantification de la protéinurie<sup>29, 30, 48, 52</sup>.

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les limites de linéarité, la répétabilité et la reproductibilité des différentes méthodes de dosage pour ces deux variables que sont la protéinurie<sup>22, 26, 33, 45, 46</sup> et la créatininurie<sup>8, 36, 38, 41, 47, 52</sup> chez l'homme. Aucune n'a cependant été faite chez le chien pour déterminer la variabilité inter et intra laboratoire de leurs dosages, alors que le RPCU est un indice indispensable de la détection, du suivi et de la gestion de la protéinurie. Les propriétaires changent fréquemment de vétérinaire (déménagement, insatisfaction,

populations nomades...) et chaque vétérinaire peut travailler avec des laboratoires différents. Il est donc important de savoir s'il est possible de suivre un même chien tout au long de sa maladie quelles que soient les conditions d'obtention des urines (concentration, volume obtenu, jour de prélèvement) et le laboratoire chargé des analyses. Il est aussi important pour un laboratoire de connaître la variabilité de ses résultats afin de garantir au clinicien un suivi rigoureux de ses patients, et la détection de nouveaux cas au sein de sa clientèle.

**Partie bibliographique :**  
**Le rapport protéines sur**  
**créatinine urinaires**



# I – Définitions

## A – Protéinurie

La protéinurie se définit comme la présence de protéines dans l'urine<sup>30</sup> : il existe une protéinurie physiologique, caractérisée par une très faible excrétion de protéines dans l'urine (voir III-A, en moyenne 200 à 230 mg/L selon la méthode utilisée<sup>3</sup>).

Les tests de routine, comme la réaction de Heller ou l'utilisation de bandelettes urinaires, ne détectent pas une protéinurie physiologique<sup>3</sup>.

Chez le chien adulte sain, la protéinurie physiologique varie peu, si le prélèvement est correctement réalisé par cystocentèse ou cathétérisme<sup>3</sup>. Dans les conditions physiologiques normales, le sexe, le poids et la surface corporelle n'influent pas sur cette excrétion de protéines urinaires<sup>30</sup>. Seul l'âge du chien joue un rôle, un chien plus âgé excréant plus de protéines<sup>25</sup>.

Par ailleurs, il existe une protéinurie pathologique que nous détaillerons plus amplement dans la partie III. Cette protéinurie étant le signe d'une affection sous-jacente (néphropathie, uropathie, etc...), son exploration complète et hiérarchisée (quantitative, puis qualitative) et répétée présente un intérêt majeur pour le clinicien, pour le diagnostic, le pronostic, la thérapeutique et le suivi d'affections chroniques.

Dans ce but, les examens biologiques dont dispose le clinicien doivent être fiables et faciles à mettre en œuvre, d'où l'intérêt présent de l'étude du RPCU.

## B – Rapport protéines sur créatinine urinaires

Il s'agit du rapport de la concentration de protéines urinaires (en mg/L) sur celle de la créatinine urinaire (en mg/L) (RPCU).

$$\text{RPCU} = \frac{[\text{Protéines urinaires}]}{[\text{Créatinine urinaire}]}$$

Variable d'intérêt

Variable correctrice

La méthode dite de référence pour quantifier une protéinurie est la collecte des urines sur 24 heures, le résultat étant exprimé en débit protéique par 24 heures<sup>17</sup>. En pratique vétérinaire courante, cette méthode est difficilement réalisable du fait de la lourdeur du protocole, du coût, et du fait que les chiens et les propriétaires supportent difficilement la mise en cage à métabolisme<sup>17</sup>.

L'étude d'un échantillon des urines du matin (les plus concentrées) ou d'une miction fraîchement émise est envisageable, mais la variabilité intra et interindividuelle de l'excrétion protéique et des volumes liquidiens rend l'interprétation délicate. Si la concentration de protéines est de 10 mg/L dans deux urines, dont le volume varie selon un facteur 2, la quantité excrétée diffère aussi par un facteur 2. Ainsi, pour une protéinurie donnée, les résultats obtenus varient en fonction du volume de la diurèse à l'instant du prélèvement et donc la quantité de protéines réellement excrétée peut être sur- ou sous-évaluée à partir de la mesure d'une simple concentration.

Le RPCU est donc une alternative plus fiable permettant de corriger cette variabilité<sup>29, 30</sup> : la concentration urinaire des protéines est mesurée dans un échantillon d'urines pris à un seul moment de la journée. La créatininurie permet de s'affranchir du volume, cette dernière étant un marqueur de concentration-dilution, la quantité de créatinine excrétée par jour pour un chien donné étant quasi constante chez le sujet adulte pour une masse musculaire stable<sup>25</sup>.

Chez le chien et chez l'homme, il y a une corrélation entre la concentration des protéines des urines récoltées sur 24 heures et le RPCU d'un échantillon d'urines pris à un seul moment de la journée<sup>3, 17, 35</sup>.

Le clinicien vétérinaire peut ainsi évaluer la protéinurie sans une collecte d'urines sur 24 heures<sup>3, 17, 35</sup>.

## II – Dosages des protéines et de la créatinine dans les urines

### A – Mesure de la concentration urinaire des protéines

#### *1 – Méthode de référence*

Les techniques de dosage actuelles répondent à plusieurs critères d'une méthode idéale, mais leurs différences analytiques peuvent conduire à des résultats différents.

Contrairement au sérum, il n'existe pas de méthode de référence pour le dosage urinaire des protéines totales<sup>27</sup>.

Deux types de méthodes présentent une sensibilité suffisante pour un dosage quantitatif de routine en laboratoire :

- La colorimétrie, dont le principe repose sur la fixation de colorants aux constituants protéiques avec modification de leur spectre d'absorption : réaction du biuret, rouge de pyrogallol, bleu de Coomassie, violet de pyrocathéchol.
- La précipitation en milieu acide (trichloracétique ou sulfosalicylique) ou en milieu alcalin (chlorure de benzéthonium) avec détection en turbidimétrie ou néphélométrie.

#### *2 – Méthodes colorimétriques*

##### *a – Réaction du biuret*

Le principe de ce dosage repose sur la mise en évidence des liaisons peptidiques qui forment, avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$ , un complexe bleu-violet en milieu alcalin.

Ce dosage est le plus souvent utilisé en laboratoire sur un automate de biochimie. L'avantage majeur de faire intervenir les liaisons peptidiques est d'obtenir une équivalence de réactivité entre les différentes protéines.

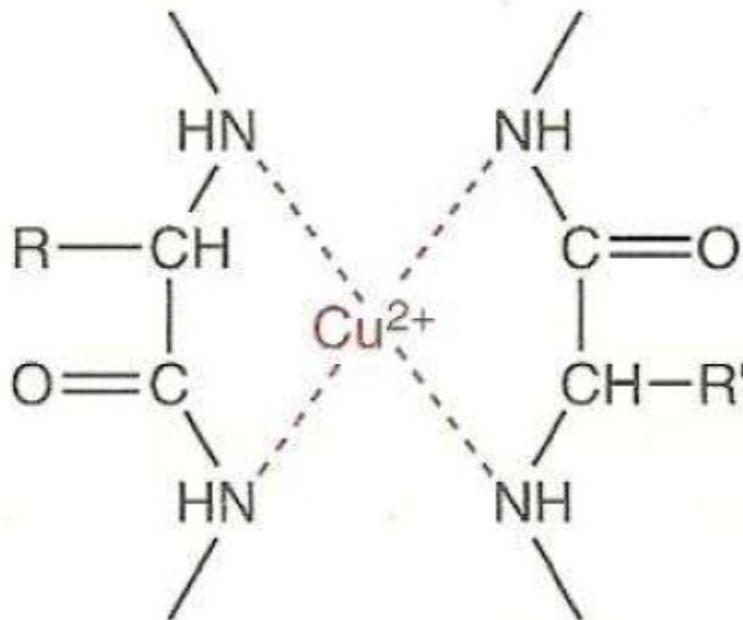


Figure 1. Complexe entre les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et les liaisons peptidiques

Le réactif utilisé est le réactif de Gornall<sup>11</sup> composé de :

- sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  pour fournir les ions  $\text{Cu}^{2+}$ ,
- une solution d'hydroxyde de sodium afin de rendre le milieu alcalin,
- du tartrate double de sodium et de potassium afin de chélater les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et éviter la formation d'hydroxyde de cuivre insoluble,
- de l'iodure de potassium afin d'éviter les réactions d'oxyréduction impliquant les ions cuivre avant le dosage.

Les urines sont mises en présence du réactif de Gornall<sup>3, 11</sup>, incubées, puis le surnageant est éliminé ; le complexe formé est ensuite mesuré par spectrophotométrie à 590 nm<sup>11</sup>.

Dans le cas de l'espèce canine, du fait de la faible quantité de protéines excrétées, cette méthode n'est pas utilisable dans des conditions identiques comme pour le dosage des protéines sériques<sup>45</sup>. Elle est dite « modifiée » : les protéines sont préalablement isolées par centrifugation<sup>45</sup> ou par précipitation à l'acide trichloroacétique ou perchlorique, puis isolées par passage sur gel de filtration<sup>11</sup>.

Cette méthode présente l'avantage de donner une réaction équivalente entre l'albumine et les globulines, mais elle nécessite de nombreuses manipulations<sup>11, 33, 45</sup>, et sa sensibilité est médiocre (environ 60 mg/L). De nombreux composés peuvent fausser le résultat : composés possédant des groupes

anioniques, métabolites colorés tels que l'hémoglobine, la bilirubine ou la myoglobine, ainsi que l'ammoniac<sup>11</sup>. Néanmoins pour les protéinuries de surcharge massive (> 5 g/L), cette technique montre une reproductibilité journalière correcte qui permet le suivi d'un patient<sup>33</sup>.

### *b – Technique au rouge de pyrogallol*

Dans cette méthode décrite initialement par Fujita et coll<sup>14</sup>, puis modifiée par Watanabe et coll<sup>46</sup>, le rouge de pyrogallol est combiné au molybdate dissodique en milieu acide (pH=2.5) et forme un complexe coloré rouge qui absorbe à 460 nm<sup>46</sup>.

De l'oxalate est ajouté afin d'éviter la réaction du molybdate avec des substances chélatrices<sup>44</sup>. En présence de protéines et en milieu acide, ce complexe se fixe sur les groupements amines des protéines<sup>44</sup> et déplace le pic d'absorption à 600 nm<sup>46</sup>.

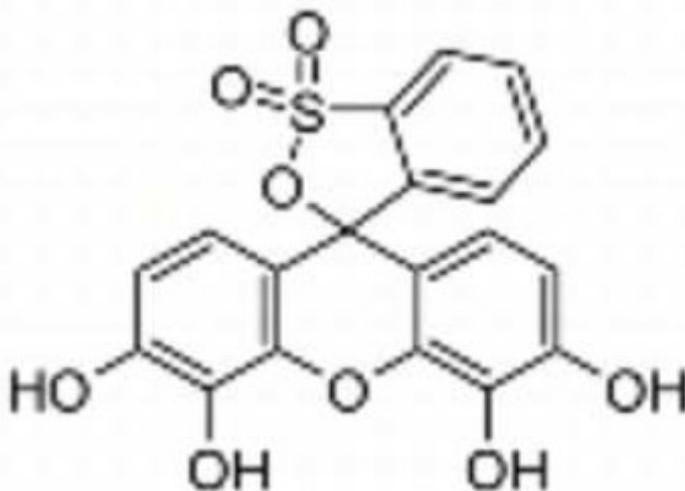


Figure 2. Complexe rouge de Pyrogallol - Molybdate

La réaction se développe en 8 min et est stable pendant 30 min<sup>44</sup>. Le colorant se fixe préférentiellement sur les groupements amines des acides aminés basiques, et peu sur ceux des acides aminés acides<sup>44</sup>.

La sensibilité de cette technique est correcte, soit 40 mg/L, et permet donc de mesurer une protéinurie physiologique<sup>44</sup>.

Son domaine de mesure est large (de 0,04 à 4 g/L)<sup>44</sup>. Elle présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et son automatisation est aisée, ce qui en fait une technique de choix à ce jour<sup>27</sup>.

Cependant, la composition très hétérogène des réactifs<sup>27</sup> utilisés selon les laboratoires (différences de pureté, de concentration du colorant, présence d'additifs) peut faire varier les résultats de manière sensible.

Les différentes solutions d'étalonnage utilisées peuvent faire varier les résultats même avec l'utilisation d'un réactif donné<sup>27</sup>.

Le rouge de pyrogallol réagit avec les pigments colorés présents dans l'urine<sup>27,44</sup>, notamment l'hémoglobine, et reconnaît en partie certains solutés de remplissage vasculaire à base de gélatine, mais ceux-ci sont moins utilisés en pratique vétérinaire courante qu'en médecine humaine.

### *c – Coloration au Bleu de Coomassie*

Le Bleu de Coomassie se lie aux protéines par adsorption aux acides aminés basiques (notamment l'arginine) et/ou aromatiques (comme la phénylalanine ou la tyrosine). Les mécanismes d'interaction entre ce colorant et les protéines sont mal connus, mais celle-ci ne se produit que pour des peptides de plus de neuf résidus.

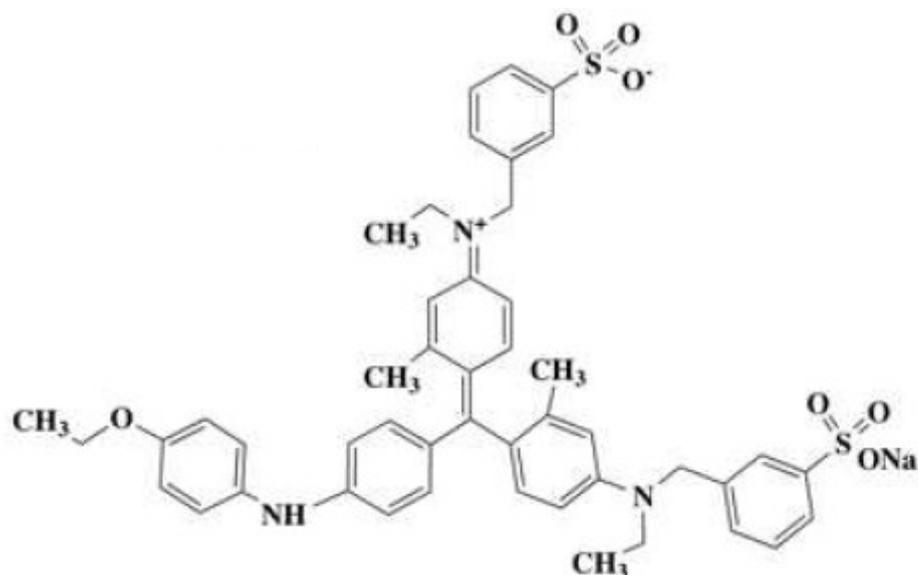


Figure 3. Bleu de Coomassie

Lorsqu'il est lié aux protéines, le pic d'absorption du bleu de Coomassie se déplace de 465 nm à 595 nm<sup>3, 16</sup>.

La fixation du colorant est complète en 2 min et la coloration est stable environ une heure<sup>3, 16</sup>. La technique est très sensible (2.5 mg/l), toutes les protéines présentes dans l'urine réagissant avec le bleu de Coomassie<sup>16, 43</sup>. Du fait de la fixation préférentielle sur certains acides aminés, toutes les protéines ne réagissent pas avec la même intensité<sup>16, 43</sup>.

L'automatisation de cette technique de coloration est rendue difficile du fait de l'adhésion du complexe colorant-protéines sur les tubulures, cuvettes réactionnelles et de mesure, ce qui nécessite un matériel à usage unique<sup>3, 33</sup>.

Le réactif est également corrosif et la technique impose deux étapes avec un prétraitement des urines par un réactif acide phosphoformolé suivi d'une centrifugation<sup>3, 33</sup>.

Cette technique est donc de moins en moins utilisée au profit des autres dosages plus faciles à mettre en oeuvre<sup>3, 27</sup>.

#### *d – Coloration au violet de pyrocatechol*

Développée en 1984, cette méthode de dosage des protéines urinaires met en jeu l'utilisation de la chimie sèche, le colorant utilisé étant le violet de pyrocatechol<sup>6, 14</sup>.

Le principe repose sur le déplacement du pic d'absorption de 450 à 670 nm lors de la fixation des protéines sur un complexe molybdate-pyrocatechol en présence d'oxalate<sup>6, 14</sup>.

Par rapport au rouge de pyrogallol, le violet de pyrocatechol est plus sensible à la composition en protéines de l'urine<sup>9, 14, 31</sup>.

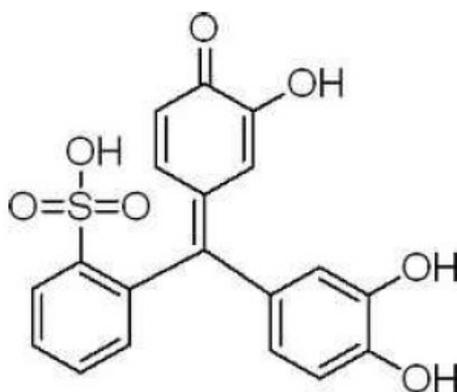


Figure 4. Violet de Pyrocatechol

### 3 – Méthodes turbidimétriques

Le principe de ces méthodes repose sur la formation d'un précipité insoluble, le plus souvent en milieu acide en suspension dans l'urine<sup>44</sup>. L'agent précipitant est, selon les laboratoires, soit l'acide sulfosalicylique, soit l'acide trichloracétique<sup>44</sup>. La précipitation en milieu alcalin est également possible, par utilisation du chlorure de benzéthonium, mais reste toutefois marginale<sup>44</sup>.

Une fois le précipité obtenu, la turbidité de la solution est évaluée par mesure de l'absorbance d'un rayon lumineux envoyé à travers l'échantillon<sup>44</sup>. Cette dispersion est corrélée au taux de précipitation et donc à la concentration initiale des protéines dans les urines<sup>44</sup>.

Les réactions de précipitation avec lecture de l'absorbance en turbidimétrie ont l'avantage d'être peu coûteuses, simples et sensibles. La sensibilité est plus élevée pour l'acide sulfosalicylique et le chlorure de benzéthonium que pour l'acide trichloracétique (10 versus 20 mg/L)<sup>44</sup>.

Cependant, ces agents précipitants sous-estiment les gammaglobulines par rapport à l'albumine, notamment dans le cas de l'acide sulfosalicylique<sup>44</sup>. Certaines protéines (notamment les protéines tubulaires) sont mal précipitées par les acides, d'où un manque d'exactitude dans leur dosage<sup>44</sup>.

De nombreuses interférences ont été décrites avec des médicaments éliminés principalement dans l'urine : pénicillines, antifongiques, aspirine et produits de contraste<sup>44</sup>.

### 4 – Autres méthodes

#### a – Bandelette réactive

Ce test repose sur le principe de la colorimétrie : les protéines forment avec le réactif (bleu de bromophénol par exemple<sup>27, 36</sup>) un complexe coloré, la modification du pH provoquant un changement de couleur<sup>27</sup>. Selon l'intensité de la réaction, la concentration en protéines est plus ou moins élevée<sup>27, 36</sup>. Cette intensité de réaction est évaluée visuellement<sup>34</sup> par l'opérateur et comparée à une échelle de couleur standardisée<sup>34, 36</sup>, ou par un lecteur automatisé<sup>36</sup>. Il existe, chez l'homme, de nombreux faux positifs ou négatifs<sup>36</sup>, notamment en fonction du pH de l'urine testée<sup>36</sup>.

L'évaluation de l'importance de la réaction est fonction de l'opérateur et de sa subjectivité. C'est pourquoi elle n'est jamais utilisée seule et le résultat doit être interprété en fonction de la densité urinaire<sup>52</sup>. Une protéinurie persistante détectée par cette méthode doit être suivie par d'autres techniques d'évaluation quantitative<sup>30</sup>.

### *b – Electrophorèse*

Il s'agit de la méthode de référence pour la différenciation des protéines dans tous les fluides<sup>13, 15, 28</sup>. Deux méthodes sont principalement utilisées<sup>15</sup> : la migration sur gel d'agarose après traitement au dodécylsulphate sodique (SDS-AGE) et l'électrophorèse haute résolution (HRE).

Le principe est la migration des protéines sur un gel, en milieu basique (pH = 8.5), auquel on applique un courant d'intensité constante pendant un temps donné (60 V/h pendant 15 min pour le SDS-AGE et 75 V/h pendant 10 min pour le HRE)<sup>15</sup>. Le gel est ensuite réhydraté et coloré avec de l'acide violet<sup>15</sup>.

Pour le SDS-AGE ou le HRE, la migration des protéines sur le gel permet de distinguer les différentes protéines présentes dans l'urine et d'en comparer les quantités relatives<sup>15</sup>. Le résultat est donné sous forme de bandes colorées, comparé à un échantillon de référence de composition connue (obtenu en même temps que l'échantillon analysé) pour le SDS-AGE<sup>15</sup>. Pour le HRE, les résultats sont donnés sous la forme d'un graphique, chaque pic correspondant à un type de protéines précis ainsi qu'à sa quantité présente<sup>15</sup>.

Les résultats obtenus permettent ainsi de déterminer l'origine de la protéinurie en fonction du type de protéines majoritairement présent<sup>15, 28</sup>.

## *5 – Données métrologiques des méthodes colorimétriques et turbidimétriques*

Le domaine de linéarité, la limite inférieure de détection, la répétabilité et la reproductibilité de différentes méthodes (rouge de pyrogallol, bleu de Coomassie, réaction du biuret et turbidimétriques) sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques métrologiques, coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité des différentes méthodes de dosages des protéines urinaires chez l'homme.

	Rouge de Pyrogallol <sup>26, 44, 46</sup>	Bleu de Coomassie <sup>33</sup>	Réaction du biuret <sup>26, 33, 45</sup>	Méthodes turbidimétriques 22, 26
<b>Domaine de linéarité</b>	0.04 à 4 g/L	0.025 à 1.5 g/L	1 à 12 g/L	0.1 à 2 g/L
<b>Limite inférieure de détection</b>	0.001 g/L	0.005 g/L	/	0.005 g/L
<b>Coefficient de variation (CV) de répétabilité</b>	1 à 3%	3 à 7%	2 à 13%	2 à 6%
<b>CV de reproductibilité</b>	3%	3%	5%	3%

Ces données permettent d'expliquer pourquoi le Rouge de Pyrogallol est la méthode la plus utilisée en laboratoire. Son domaine de linéarité lui permet d'être utilisé avec un intervalle large de concentration de protéines, et ce avec une limite de détection plus basse que pour les autres techniques.

## B – Mesure de la concentration urinaire de la créatinine

Il n'y a pas de méthode de référence pour le dosage de la créatinine dans les urines, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) étant la méthode de référence pour la mesure de la créatinine plasmatique<sup>38</sup>.

### *1 – Méthode colorimétrique : méthode de Jaffé*

La réaction de la créatinine avec l'acide picrique forme un complexe de couleur rouge-orangé, mesurable par spectrophotométrie à 520 nm<sup>39, 47</sup>.

De nombreuses molécules réagissent aussi avec les ions picrates (glucose, protéines, céphalosporines, etc.)<sup>39, 47</sup>. La mesure de la cinétique de la réaction permet de minimiser ces interférences<sup>39, 47</sup> car leurs vitesses de réaction sont différentes. Une

précipitation ou une filtration préalable des protéines<sup>39, 47</sup> (méthode de Jaffé modifiée) permet aussi de réduire les interférences.

Des molécules comme la bilirubine ou les corps cétoniques entraînent des défauts d'exactitude<sup>39, 47</sup>.

La température ambiante doit être contrôlée car elle a une influence importante sur la cinétique de la réaction<sup>39, 47</sup>.

## 2 – Techniques enzymatiques

### a – Utilisant la créatinine aminohydrolase

Cette enzyme dégrade la créatinine en créatine, laquelle ne peut être dosée directement<sup>2</sup>. L'action d'autres enzymes (créatine kinase donnant la créatine phosphate, créatinase donnant la sarcosine) permet une mesure par spectrophotométrie à 340 nm pour la créatine phosphate ou à 510 nm pour la sarcosine<sup>7</sup>.

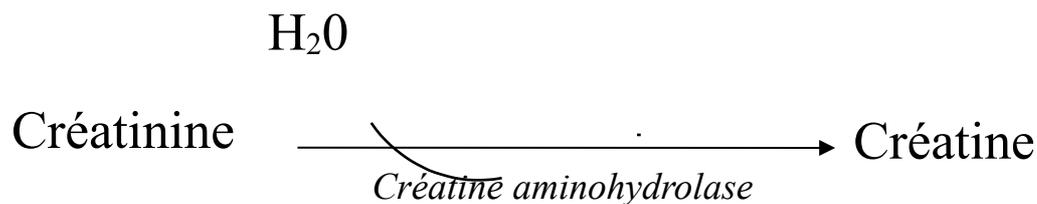


Figure 5. Dégradation de la créatinine en créatine, par l'action de la créatinine aminohydrolase.

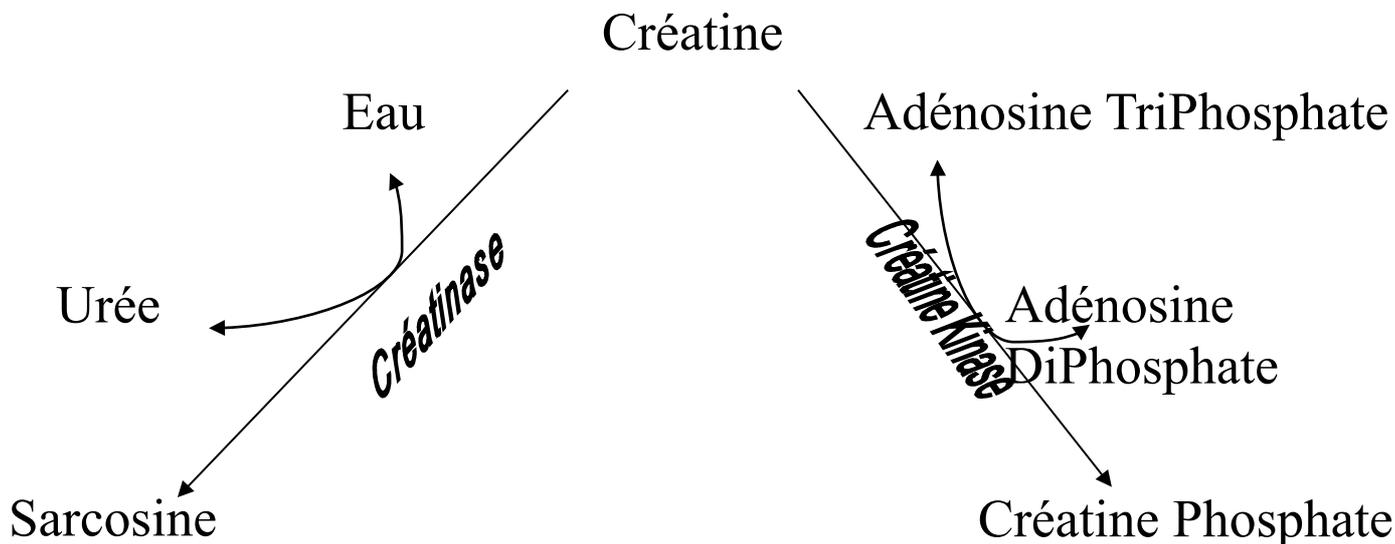


Figure 6. Dégradation de la créatine en créatine phosphate et en sarcosine, par l'action de la créatine kinase et la créatinase.

Néanmoins, la réaction avec la créatine kinase manque de sensibilité dans la zone de valeurs physiologiques. La réaction avec la créatinase, plus sensible, est faussée par l'interaction de molécules comme la bilirubine.

L'urine peut être préalablement traitée par des enzymes comme la bilirubine oxydase pour limiter ces interférences.

#### b – Utilisant la créatinine désaminase

La créatinine est dégradée en N-méthylhydantoïne et en ion ammonium. La quantité d'ions ammonium est directement proportionnelle à la quantité initiale en créatinine<sup>41</sup>. Les ions ammoniums sont dosés<sup>41</sup>, soit grâce à une électrode sélective, soit grâce à l'utilisation de glutamate déshydrogénase. Le L-glutamate obtenu par cette réaction est mesuré par spectrophotométrie, dans l'ultraviolet<sup>41</sup>.

Les ions ammonium endogènes interagissent naturellement avec le dosage. Ils sont soit éliminés lors d'une étape préliminaire, soit dosés au préalable. Le résultat de ce dosage, retranché du résultat final, permet d'obtenir la quantité d'ions ammonium issus de la créatinine, donc la concentration de créatinine de l'urine. La reproductibilité du dosage est cependant diminuée.

La bilirubine, le glucose, l'hémoglobine, certains antibiotiques (pénicillines, chloramphénicol) et même l'urée, interfèrent avec le dosage<sup>41</sup>.

### 3 – Techniques chromatographiques

Ces techniques sont utilisables dans tous les fluides (sérum, plasma, urine), et constituent la méthode de référence pour le dosage de la créatinine dans le sérum et le plasma<sup>38</sup>. La créatinine est séparée par CLHP, en phase inverse octadécylsilane, sous haute pression, en milieu isocratique<sup>53</sup>, sur résine échangeuse de cations<sup>20</sup> ou par formation de paires d'ions<sup>12</sup>.

Le temps de rétention de la créatinine dépend du pH, de la force ionique et du débit du tampon utilisé<sup>12, 20, 53</sup>. Au préalable, les protéines sont éliminées par précipitation en milieu acide, par filtration ou par une pré-colonne sur la même phase<sup>12, 20, 53</sup>. Leur complexité et leur coût expliquent que ces méthodes soient peu utilisées en technique courante<sup>38</sup>.

La détection de la créatinine se fait par mesure de l'absorbance entre 200 et 260 nm. Le pic d'absorption est comparé à une gamme aqueuse d'étalons de créatinine (créatinine pure en solution aqueuse)<sup>12, 20, 53</sup>.

Les résultats avec la technique de Jaffé sur ces gammes d'étalons de créatinine sont surestimés de 15 à 30% par rapport aux résultats par CLHP<sup>38</sup>.

### 4 – Données métrologiques (chez l'homme)

#### a – Domaine de mesure

Dans le sérum et le plasma, les limites supérieures de linéarité pour chacune de ces techniques varient de 1000  $\mu\text{mol/L}$  à 2000  $\mu\text{mol/L}$ . Or les urines sont beaucoup plus concentrées<sup>38</sup> (en moyenne 4700  $\mu\text{mol/L}$  à 42 000  $\mu\text{mol/L}$  chez l'homme, en fonction de la dilution des urines, de l'activité physique et des variations individuelles)<sup>8, 36, 52</sup>. Pour cette raison, il est nécessaire de diluer les urines avant de procéder au dosage.

#### b – Reproductibilité

La reproductibilité dépend des techniques utilisées et des concentrations de créatinine. Dans le plasma et le sérum, aucune technique ne permet d'avoir une variabilité inter-laboratoire inférieure à 5% pour une concentration de 70  $\mu\text{mol/L}$ <sup>41, 47</sup>.

Les résultats moyens, toujours dans le sérum et le plasma, quelle que soit la technique employée, ne s'écartent pas de plus de 10% de la moyenne générale, sauf pour les concentrations inférieures à 100  $\mu\text{mol/L}$ . Les différences entre les techniques sont alors plus importantes (50% d'écart entre les valeurs extrêmes)<sup>41-47</sup>.

L'inverse se produit (davantage d'écarts entre les résultats pour des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{mol/L}$ ), lors d'interférences avec la méthode de Jaffé.

## C – Conservation des urines

Dans les urines, chez l'homme, les protéines sont stables pendant 7 jours à température ambiante, 30 jours à 4°C et plus de 6 mois à -20°C<sup>42</sup>. La créatinine, toujours chez l'homme, quant à elle, est stable à température ambiante pendant plusieurs semaines (la durée et la température n'ayant pas d'influence sur la stabilité de la créatinine) et une conservation à -20°C ne l'altère pas<sup>40</sup>. Les conservateurs sont à proscrire car certains peuvent interférer par la suite dans le dosage, celui des protéines notamment<sup>37</sup>.

Chez le chien, le RPCU n'est pas altéré pendant 3 mois si les échantillons sont conservés à -20°C<sup>37</sup>.

Ces propriétés permettent donc l'envoi d'échantillons congelés d'urine à des laboratoires éloignés géographiquement, comme cela a été le cas dans l'étude expérimentale de cette thèse.

### **III – La protéinurie chez le chien**

#### **A – Les protéines normalement présentes**

Les protéines présentes dans l'urine, chez l'homme et chez le chien, se divisent en trois catégories<sup>13, 45</sup> :

- les protéines sanguines : 40 à 60 % d'albumine, des  $\gamma$ -globulines, des  $\alpha$ -glycoprotéines, de la transferrine<sup>28</sup>, la protéine RBP (Retinol Binding Protein)<sup>44</sup>, et des chaînes légères d'immunoglobulines<sup>44</sup>,
- les protéines issues des tubules (protéines de Tamm–Horsfall et protéines uromucoïdes)<sup>13, 29</sup>,
- les protéines issues des organes génitaux, surtout chez le chien mâle<sup>3, 48</sup>.

La quantité totale de ces protéines est faible. Le tableau 2 résume la quantité de protéines excrétée par jour chez le chien, en fonction des études et des méthodes utilisées, ainsi que selon les caractéristiques des animaux testés. Il est admis qu'un RPCU > 0.5 est anormal chez le chien<sup>30</sup>.

Tableau 2. Excrétion protéique journalière chez le chien cliniquement sain, selon différentes études.

<b>Auteurs</b>	<b>Méthode de dosage</b>	<b>Chiens utilisés</b>	<b>Moyenne de la protéinurie observée (mg/kg/jour)</b>
Barsenti et al. <sup>3</sup>	Bleu de Coomassie	10 chiens Beagles, 1 an	7.0
	Ponceau S	10 chiens Beagles, 1 an	3.32
McCaw et al. <sup>32</sup>	Bleu de Coomassie	14 chiens Beagles, de 5 à 10 ans	7.6
Grauer et al. <sup>17</sup>	Bleu de Coomassie	16 chiens Beagles, de 9 à 11 mois	2.3
Laroute et al. <sup>25</sup>	Bleu de Coomassie	10 chiens Beagles, de 6 à 9 ans	48.0
		10 chiens Beagles, de 6 à 8 mois	6.0
Lane et al. <sup>24</sup>	Bleu de Coomassie	6 chiens Beagles, de 9 à 27 semaines	5.0
Biewenga et al. <sup>4</sup>	Ponceau S	29 chiens, de 0.5 à 10 ans	6.6
White et al. <sup>48</sup>	Ponceau S	8 chiens, de 0.5 à 4 ans	4.8
Center et al. <sup>8</sup>	Turbidimétrie	19 chiens	2.5
DiBartola et al. <sup>10</sup>	Electrophorèse	17 chiens	13.9

## B – Causes

Les protéinuries se classent en deux catégories<sup>30</sup> : physiologique. ou pathologiques.

### *1 – Les protéinuries rénales d'origine fonctionnelle*

Elles sont intermittentes et causées, par exemple, par la fièvre, une infection, un effort physique important<sup>30, 45</sup> ou la gestation<sup>27</sup>. Ces protéinuries sont transitoires et peu élevées (RPCU < 2, puis RPCU < 0.5 deux à quatre semaines plus tard<sup>30</sup>).

### *2 – Les protéinuries pathologiques*

Elles sont divisées en trois sous-groupes<sup>30</sup> : pré-rénales, rénales ou post-rénales

- pré-rénales, ces protéinuries sont dues à une concentration anormale en protéines plasmatiques, la barrière glomérulaire conservant sa sélectivité. Elles sont causées, par exemple, par des tumeurs comme les myélomes et les leucémies<sup>30-45</sup> ou l'hypertension artérielle systémique<sup>27</sup>. Parmi les protéines présentes se trouvent, entre autres, l'hémoglobine, la myoglobine, ou encore les protéines de Bence-Jones.

- rénales, ce sont les protéinuries induites par des lésions fonctionnelles ou structurelles des reins<sup>30</sup> :

- glomérulaires : la barrière glomérulaire perd sa sélectivité et laisse passer les protéines sériques (albumine, globuline) qui représentent 90% des protéinuries et sont associées à un syndrome néphrotique et une IRC. Les causes en sont multiples : lupus érythémateux disséminé, maladies infectieuses, leucémie, carcinome, lymphome, diabète, etc.
- tubulaires : la réabsorption tubulaire est insuffisante voire absente. Cela peut être dû à des anomalies congénitales, des myélomes, une insuffisance rénale aiguë, une pyélonéphrite, des médicaments néphrotoxiques...
- interstitielles : des lésions du parenchyme causent une exsudation des protéines vers la lumière des tubules et des tubes collecteurs. Ce phénomène existe lors de néphrite interstitielle conduisant aussi à une IRC.

- post rénales<sup>26</sup> : ces protéinuries sont dues à la présence de lésions et/ou d'inflammations des voies urinaires ou génitales.

Ces trois types de protéinuries peuvent être plus ou moins associés, et certains la conséquence d'un autre. Ainsi une hypertension artérielle systémique entraîne une protéinurie pré-rénale évoluant vers une destruction des glomérules et donc une protéinurie rénale<sup>27</sup>.

Les protéinuries glomérulaires sont persistantes et de forte intensité (RPCU > 2, trois fois à deux semaines d'intervalle<sup>30</sup>), alors que les protéinuries tubulaires sont plus modérées.

## C – Conséquences

Chez le chien, la présence d'une protéinurie associée à une néphropathie est un facteur d'aggravation<sup>30, 49</sup>. Il a été démontré, chez le chien et chez l'homme, que plus la protéinurie est importante, plus la fonction rénale est dégradée<sup>5, 30, 43</sup>. Le degré de protéinurie est corrélé au taux de progression de l'IRC et des altérations morphologiques des reins<sup>1, 5, 43</sup>. Ainsi, un chien présentant une protéinurie avec un RPCU > 1 a trois fois plus de risques de développer une crise urémique qu'un chien ayant un RPCU < 1<sup>23</sup>.

Cette aggravation est due à des lésions tubulo-interstitielles (apoptose des cellules tubulaires) ainsi qu'à des lésions glomérulaires (sclérose), les deux étant de surcroît corrélées<sup>1, 23</sup>.

Les premières lésions rénales vont entraîner par réaction une augmentation tissulaire de la concentration en angiotensine 2 pour compenser la perte de débit de filtration glomérulaire (DFG). Cette augmentation entraîne à terme une fibrose du glomérule<sup>43</sup> et une perte de la sélectivité de la barrière glomérulaire (passage des protéines de poids moléculaire de plus en plus important, phénomène démontré chez l'homme et le rat)<sup>43, 51</sup>. La première protéine dont la concentration augmente dans les urines est l'albumine, ce qui induit l'apoptose des cellules tubulaires (mécanisme démontrée chez la souris et le rat)<sup>43, 51</sup>, donc une diminution de la capacité de réabsorption des néphrons<sup>43</sup>.

Tout ceci conduit à une augmentation de plus en plus importante de la quantité et du type de protéines dans les urines et à l'installation d'un cercle vicieux : les protéines induisent des lésions qui favorisent le passage d'un plus grand nombre de protéines.

La protéinurie est donc un médiateur et un marqueur des maladies rénales protéinuriques, et tout particulièrement de l'IRC<sup>30, 43</sup>.

## D – Implications cliniques

La détection précoce d'une protéinurie pathologique permet un diagnostic précoce des maladies rénales protéinuriques et leur pronostic, aussi bien chez l'homme que chez le chien<sup>23, 30, 43</sup>.

Cette détection précoce est indispensable car lorsque la fonction rénale est altérée, le parenchyme rénal est en grande partie détruit. Il faut mettre rapidement en place le traitement approprié pour ralentir l'évolution des lésions et ainsi préserver le parenchyme fonctionnel restant. En effet, réduire la protéinurie permet de ralentir les phénomènes d'apoptose et de sclérose et donc l'évolution de la maladie<sup>1, 43</sup>.

Ainsi, une fois la maladie rénale détectée, le suivi de la protéinurie permet de suivre l'efficacité du traitement mis en place. Des molécules comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine 2 de type 1 ont des propriétés néphroprotectrices et réduisent la protéinurie<sup>43</sup>. Ce suivi permet également d'évaluer l'évolution de la maladie et d'adapter le traitement déjà mis en place.

## **IV – Utilisation du rapport protéines sur créatinine urinaires**

### A – Interprétation

Le niveau lésionnelle de la protéinurie doit être déterminée<sup>30</sup>. La première étape est d'exclure l'origine post-vésicale (bas appareil urinaire, après la vessie) et extra-urinaire, due, par exemple, à une inflammation des voies génitales. Pour cela, l'échantillon d'urine doit être obtenu par cystocentèse<sup>30</sup>. La deuxième étape est l'exclusion d'une origine pré-rénale en évaluant la concentration plasmatique en protéines<sup>30</sup>. La dernière étape est d'observer le sédiment urinaire<sup>30</sup>. En l'absence de signe d'inflammation ou d'hémorragie dans le sédiment et à l'examen clinique (pollakiurie par exemple), l'origine post-rénale (inflammation de voies urinaires : uretères et vessie) peut être exclue<sup>30</sup>. Seulement alors, l'origine rénale de la protéinurie pourra être confirmée.

Le caractère persistant de la protéinurie doit aussi être vérifié<sup>30</sup>. Une protéinurie est persistante lorsqu'elle est détectée deux fois à un mois d'intervalle<sup>30</sup>. La persistance établie, la définition des seuils de RPCU va permettre de choisir la conduite à tenir<sup>29, 30</sup>.

Différents seuils ont été définis chez le chien, pour permettre l'interprétation des résultats de RPCU<sup>29, 30</sup> :

- < 0.2 : pas de protéinurie,
- 0.2 < RPCU < 0.5 : pas de certitude quant à la présence ou l'absence d'une protéinurie,
- > 0.5 : protéinurie.

Un RPCU > 2 et persistant permet d'affirmer l'origine glomérulaire de la protéinurie<sup>30</sup>. Un résultat entre 1 et 2 ne permettant pas la différenciation entre une origine glomérulaire et tubulaire, il faut renouveler les tests pour observer l'évolution de la protéinurie. Les protéinuries tubulaires restent peu élevées<sup>30</sup>. En cas de protéinurie interstitielle, d'autres signes cliniques, comme de la fièvre, peuvent être présents<sup>30</sup>.

## B – Contexte d'utilisation

Le RPCU est utilisé pour le diagnostic des maladies rénales afin de quantifier la protéinurie après sa détection par des méthodes de routine moins précises car semi-quantitatives (bandelettes ou réactions de Heller)<sup>1, 3, 30</sup>, en association avec d'autres examens (analyse d'urine complète, biochimie sanguine).

Les recommandations actuelles<sup>30</sup> sont de tester tous les animaux reçus en consultation, même s'ils sont apparemment sains. Selon la réponse des tests semi-quantitatifs, le RPCU est évalué<sup>30, 52</sup> (Tableau 3).

Tableau 3. Evaluation du RPCU en fonction des résultats du dosage semi-quantitatif des protéines avec une bandelette urinaire et de la densité urinaire<sup>52</sup>.

<b>Résultats de la bandelette urinaire</b>			
<b>Densité urinaire</b>	<b>0+ (0 mg/L)</b>	<b>1+ (0,3 g/L)</b>	<b>≥ 2+ (≥ 1 g/L)</b>
≤ 1.012	Absence de protéinurie	RPCU (d)	RPCU (g)
> 1.012 et <1.030	Absence de protéinurie	Absence de protéinurie	RPCU (g)
≥ 1.030	Absence de protéinurie	Absence de protéinurie	RPCU (g)

(d) : la quantification de la perte protéique grâce au RPCU est nécessaire pour diagnostiquer une protéinurie. (g) : la quantification de la perte protéique grâce au RPCU est nécessaire pour quantifier la protéinurie

### C – Suivi du RPCU en thérapeutique

Pour un animal dont le RPCU est inférieur à 0.2, aucun traitement n'est mis en place<sup>30, 21</sup>. Pour tous les autres niveaux de RPCU, l'International Renal Interest Society (IRIS)<sup>21</sup> a mis en place plusieurs recommandations en fonction du stade clinique présenté par l'animal<sup>21</sup> (tableau 4).

Tableau 4. Classification et recommandations de l'IRIS pour l'évolution de l'IRC<sup>21</sup>.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Stades IRIS	<b>Insuffisance rénale légère</b>	<b>insuffisance rénale modérée</b>	<b>insuffisance rénale avancée</b>	<b>stade terminal</b>
Créatinine plasmatique	< 14 mg/L	15 à 23 mg/L	24 à 50 mg/L	> 50 mg/L
<b>Seuil de RPCU pour lequel un traitement est mis en place</b>	>2	> 0.5	> 0.5 (si absence de crise urémique aiguë)	Si pas de traitement spécifique déjà instauré, il est illusoire de le mettre en place.

Au stade 1, si le RPCU est compris entre 0.5 et 1, un protocole de surveillance est mis en place : répétition des mesures pour détecter des différences avec les précédents résultats pour agir au plus vite en cas d'augmentation. La fréquence de la surveillance est à adapter en fonction de l'animal<sup>21-30</sup> (âge, prédisposition à une maladie rénale génétique par exemple). Au-delà d'une valeur de 2, le traitement doit être initié.

Pour les autres stades, si le RPCU est supérieur à 0.5, une exploration de la protéinurie est mise en place pour en définir l'origine et la nature (électrophorèse des protéines), en déterminer la cause, et si possible la traiter<sup>30</sup>. Si le RPCU est très élevé (RPCU > 2), il faut en premier lieu traiter la protéinurie : adaptation de l'alimentation (restriction protidique) et/ou traitement médicamenteux (IECA, anti-hypertenseur comme l'amlodipine dans le cas d'une hypertension artérielle systémique associée). Pour le stade 4 terminal, la mise en œuvre d'un traitement n'est généralement pas recommandée.

Les IECA sont utilisés car ils ont un effet hypoprotéinuriant chez le chien<sup>18</sup>. Ils réduisent la pression artérielle systémique et la pression intraglomérulaire. La baisse de l'hyperfiltration glomérulaire ralentit le développement des lésions du glomérule. D'autres effets des IECA ont été mis en évidence<sup>18</sup> : ralentissement de l'apparition ou de la progression de l'azotémie et limitation des lésions rénales (fibrose). L'action des IECA sur l'évolution de la protéinurie peut donc être un indicateur de leurs autres effets<sup>18</sup>.

Une fois la protéinurie détectée et le traitement mis en place, l'utilisation du RPCU permettra de suivre l'évolution de la maladie et l'efficacité du traitement<sup>21, 29, 30, 43</sup>. Un RPCU qui diminue après la mise en œuvre du traitement indique une diminution de la protéinurie et donc l'efficacité du traitement. A l'inverse, s'il augmente alors la maladie progresse et il faut adapter le traitement<sup>30</sup>, en augmentant par exemple les doses d'IECA.

**Partie expérimentale :**  
**Etude de la variabilité inter-**  
**et intra-laboratoire de la**  
**mesure du rapport protéines**  
**sur créatinine urinaires**



## **I – Problématique et objectifs**

Différentes méthodes sont utilisées pour doser les concentrations urinaires de protéines et créatinine. Le RPCU pourrait donc différer selon la méthode utilisée.

Tous les laboratoires n'utilisent pas les mêmes méthodes, ni les mêmes techniques. Un chien pourrait donc être déclaré sain ou malade selon le laboratoire réalisant l'analyse urinaire. Ainsi, un chien sain pourrait être traité pour une protéinurie qu'il n'a pas, et réciproquement un chien malade pourrait ne pas recevoir les soins adéquats.

Il est donc nécessaire de documenter la variabilité inter-laboratoire. De même, la variabilité intra-laboratoire pour la mesure du RPCU chez le chien est mal documentée. Un effet de cette variabilité sur l'interprétation du RPCU ne peut donc pas être exclu.

Les objectifs de cette étude ont été de mesurer la répétabilité et la reproductibilité du rapport protéines sur créatinine urinaires (RPCU) au sein de cinq laboratoires et d'évaluer les différences éventuelles de mesure du RPCU entre ces laboratoires.

## **II – Matériels et méthodes**

### **A – Laboratoires**

Cinq laboratoires ont participé à l'étude : le laboratoire de Pfizer (Royaume-Uni), le laboratoire de l'université vétérinaire de Davis (Etats-Unis), le laboratoire de Vébiotel (France), le laboratoire de Novartis (Suisse), et le laboratoire central de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) (France).

L'étude a été réalisée en aveugle, chacun de ces laboratoires ayant été identifié au préalable par une lettre (A, B, C, D et E) attribuée au hasard. Chaque laboratoire était au courant de sa participation à l'étude et des conditions de dosage requises.

## B – Préparation des spécimens d'urines

Des spécimens d'urine avec différentes concentrations de protéines (par enrichissement avec des protéines sériques) et de créatinine (par dilution des urines) ont été préparés. Le schéma général de préparation des spécimens d'urine est présenté dans la figure 7.

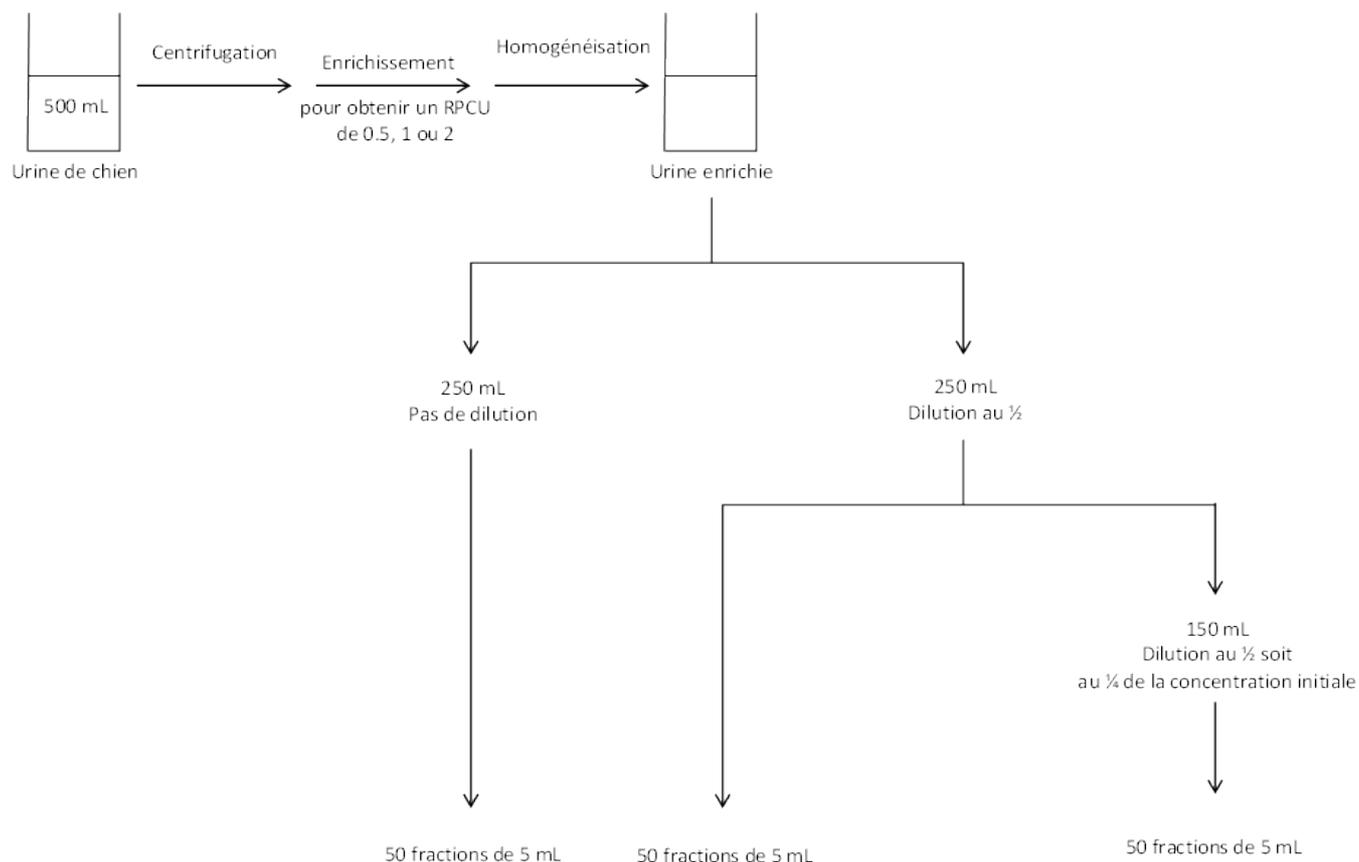


Figure 7. Etapes de préparation des échantillons d'urines à analyser.

## C – Source animale des urines et des protéines

Deux groupes de chiens ont été utilisés : un pour la récolte des urines et l'autre chez lequel des échantillons de sang ont été prélevés pour enrichir les urines en protéines.

Les urines ont été prélevées sur quatre chiennes Beagle adultes et saines de  $18 \pm 3$  mois (moyenne  $\pm$  écart-type (SD)) (groupe 1). Elles ont été identifiées par les chiffres 1 à 4.

Pour les prélèvements sanguins, deux mâles et une femelle Beagle adultes et sains âgés de  $40 \pm 4$  mois (groupe 2) ont été utilisés.

Tous les animaux provenaient de l'élevage des Souches (89130, Mezilles, France). Ils étaient hébergés dans l'unité de physiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) dans le respect des conditions réglementaires concernant l'expérimentation animale.

## D – Obtention des urines

Les chiens du groupe 1 ont été placés dans des cages à métabolisme individuelle pendant 3 jours, et l'urine produite durant ce temps a été recueillie.

500 mL d'urine ont été ainsi obtenus pour chaque animal. Chaque urine a été centrifugée à 3000 g durant 10 minutes, puis le surnageant a été récupéré. Les concentrations des protéines et de la créatinine ont été dosées pour déterminer la quantité de protéines à ajouter lors de l'enrichissement des urines (Annexe I).

## E – Enrichissement des urines

### *1 – Obtention des protéines sériques*

Chaque jour, 18 mL de sang ont été prélevés sur chaque animal du groupe 2, trois jours de suite (soit 162 mL de sang au total, 18 ml x 3 jours x 3 chiens), et placés dans des tubes secs siliconés (Annexe I-A).

Ces tubes ont été laissés deux heures à température ambiante, puis centrifugés dix minutes à 3000 g.

Le sérum obtenu a été récupéré et stocké dans des tubes secs de 5 mL, puis congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ , en attendant d'être utilisé.

### *2 – Détermination du volume de sérum à ajouter*

La collecte des urines effectuée, les tubes de sérum ont été décongelés, mélangés et homogénéisés. La concentration sérique des protéines a été dosée

pour déterminer le volume de sérum à ajouter aux urines pour obtenir le RPCU désiré (Annexe I–B).

Les urines des chiens 1, 2 et 3 ont été enrichies par, respectivement, 2.6 mL, 10.1 mL et 29.5 mL de sérum, afin d'obtenir des valeurs théoriques de RPCU de 0.5, 1 et 2 (Annexe I–C). Les urines du chien 4 n'ont pas été enrichies, pour conserver un RPCU inférieur à 0.5, soit celui d'un chien sain.

## F – Préparation des échantillons

### *1 – Dilution*

Chacune des urines enrichies des chiens 1 à 3 et l'urine non enrichie du chien 4 a été diluée avec de l'eau ultra-pure. Pour une urine donnée, 250 mL ont été conservés à la dilution initiale, le reste a été dilué au demi : 500 mL d'urine diluée une première fois ont été ainsi obtenus, puis 150 mL de cette urine diluée ont été à nouveau dilués au demi (Figure7).

Au total, trois fractions de chaque urine ont été obtenues : 250 mL sans dilution, 350 mL dilués au demi et 300 mL dilués au quart.

Cette dilution a été vérifiée au densitomètre après homogénéisation.

### *2 – Échantillonnage*

Chaque dilution de chaque chien a été aliquotée pour obtenir 50 fractions de 5 mL. Ces fractions ont été ensuite réparties dans des tubes secs de 10 mL. Nous avons ainsi obtenu 150 tubes (50 fractions x 3 dilutions) par chien, soit un total de 600 tubes pour les quatre chiens choisis pour notre étude.

Chacun des tubes a été identifié par un numéro aléatoirement choisi, puis l'ensemble a été réparti en cinq groupes. Chaque groupe contenait 5 tubes de chaque dilution ( $n = 3$ ) de chaque chien ( $n = 4$ ), soit 60 tubes.

Les tubes restant ont été conservés au laboratoire de physiologie de l'ENVT.

Tous les tubes ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'envoi des lots aux différents laboratoires cités précédemment.

### *3 – Envoi aux laboratoires*

Chaque groupe de tubes a été envoyé à chaque laboratoire le même jour. L'envoi a été effectué sous carboglace, les échantillons étant reçus sous un délai de 48 heures.

## G – Dosage des échantillons

### *1 – Déroulement des dosages*

Les cinq laboratoires ont dosé les échantillons dans des délais similaires.

La programmation des dosages de l'ensemble des tubes était imposée à chaque laboratoire. Ces dosages devaient être réalisés sur deux jours : pour une dilution donnée, chaque laboratoire dosait trois tubes un jour et les deux derniers le lendemain.

Chaque laboratoire a réalisé ses dosages en aveugle, n'ayant pas la connaissance de la correspondance entre le numéro du tube et son contenu réel obtenu par un enrichissement en protéines et dilution.

### *2 – Méthodes de dosage*

Les caractéristiques des méthodes de dosage utilisées sont décrites dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5. Caractéristiques des méthodes de dosage de la créatinine urinaire des différents laboratoires : méthode, technique, contrôle qualité et nombre d'échantillons dosés par mois.

Laboratoire	A	B	C	D	E
<b>Méthode</b>	Jaffé modifiée	Jaffé modifiée	Jaffé modifiée	Jaffé modifiée	Enzymatique
<b>Technique/ Matériel</b>	Instrumentale Hitachi 917	Non communiqué	Instrumentale Synchron CX5 Chemistry Analyser	Instrumentale Konelab 20 Réactif thermo	Manuelle dry slide technology, Vitros
<b>Contrôle qualité</b>	Calibration journalière avec « Roche PreciNorm » et « Roche PreciPath »	Non communiqué	1 calibration avant la séquence de dosage, 1 contrôle avant et après	1 contrôle par jour à 1.69 g/L	1 contrôle par jour
<b>Nb dosage/ mois</b>	50	Non communiqué	80	Non communiqué	5

Tableau 6. Caractéristiques des méthodes de dosage des protéines urinaires des différents laboratoires : méthode, technique, contrôle qualité et nombre d'échantillons dosés par mois.

Laboratoire	A	B	C	D	E
<b>Méthode</b>	Rouge de Pyrogallol	Rouge de Pyrogallol	Rouge de Pyrogallol	Rouge de Pyrogallol	Rouge de Pyrogallol
<b>Technique/ Matériel</b>	Instrumentale Hitachi 917	Non communiqué	Instrumentale Urine analyser Clinitech Atlas	Instrumentale Konelab 20 Réactif thermo	Manuelle Secomam 500 spectrophotometer
<b>Contrôle qualité</b>	Calibration à deux niveaux, à 0.752 g/L et à 0.751 g/L	Non communiqué	1 calibration avant la séquence de dosage, 1 contrôle avant et après	1 contrôle par jour à 0.6 g/L	1 contrôle par jour, à 0.3–0.35 g/L
<b>Nb dosage/ mois</b>	50	Non communiqué	30	Non communiqué	5

## H – Modèle statistique

Les statistiques ont été réalisées par l'association ETIC de l'INSA de Lyon.

Différents modèles statistique ont été utilisés, car les données ne suivaient pas toutes une loi Normale.

### *1 – Statistiques descriptives*

Les valeurs du RPCU, de la concentration urinaire de protéines et de la concentration urinaire de créatinine ont été représentées par des « boîtes à moustaches » pour les résultats par laboratoires, et sous forme de graphiques pour les résultats pour chaque chien, chaque dilution et par laboratoire.

L'homogénéité ou l'hétérogénéité des résultats a été évaluée par un test de Bartlett. L'hypothèse nulle  $H_0$  de ce test dit que les variances des échantillons sont identiques, l'hypothèse  $H_1$  dit qu'au moins deux d'entre elles sont différentes.  $H_0$  est vraie si la valeur de  $p$  est inférieure à 0.05.

### *2 – Effet de la dilution sur le RPCU*

Il y a un effet « chien » (concentrations de protéines et de créatinine différentes) sur les valeurs de RPCU, puisque nous avons décidé artificiellement d'avoir différents RPCU. Une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée, car le nombre de chiens n'est pas suffisant pour utiliser un modèle mixte pour chaque laboratoire.

L'écriture mathématique de ces analyses est :

$$y = \beta_0 + \beta_1 * I_{\text{dilution1}} + \beta_2 * I_{\text{dilution0.5}} + \beta_3 * I_{\text{dilution0.25}} + \beta_4 * I_{\text{chien1}} \\ + \beta_5 * I_{\text{chien2}} + \beta_6 * I_{\text{chien4}} + \beta_7 * I_{\text{chien4}} + \beta_8 * I_{\text{dilution}} * I_{\text{chien}} + \varepsilon$$

Avec :

$I$  = variables indicatrices

$y$  = valeur moyenne de RPCU

$\beta$  = effet fixe (laboratoire)

$\varepsilon$  = valeur résiduelle (écart entre les valeurs modélisées et les valeurs observées) =

$CV_{\text{intra}}$

### 3– Effet du laboratoire sur le RPCU

Un test de Shapiro–Wilk indique que les données de RPCU (tout laboratoire et tout chien confondus) ne suivent pas une loi Normale (valeur de  $p = 2.2 \cdot 10^{-16}$ ). Les tests paramétriques usuels, tels qu'une ANOVA par exemple, pour étudier l'influence des laboratoires ne sont pas utilisables.

A la place, le test de Quade, un test non paramétrique, est choisi. Il présente l'avantage de prendre en compte le fait que les données sont appariées (les échantillons proviennent du même individu). L'hypothèse nulle de ce test est alors la suivante :  $H_0$  – "En tenant compte de l'éventuel effet chien, les dosages de RPCU donnés par les laboratoires sont globalement égaux".

### 4 – Comparaison interlaboratoires pour le RPCU

Pour pouvoir comparer les résultats des laboratoires entre eux, il faut tenir compte du fait que les résultats de RPCU diffèrent selon le chien. Dans cette optique, on construit un modèle à effets mixtes en considérant les laboratoires comme effet fixe et la variable "chien" comme aléatoire.

L'écriture du modèle mathématique est la suivante :

$$y_{ij} = \alpha + X_j \cdot \beta + Z_i \cdot b_i + \varepsilon$$

Avec :

- $y_{ij}$  = valeurs de RPCU pour le chien  $i$  et le laboratoire  $j$
- $X_j$  = effet fixe du laboratoire  $j$
- $Z_i$  = effet aléatoire du chien  $i$
- $\alpha$  = intercept (valeur moyenne de  $y_{ij}$  pour les niveaux de référence)
- $\beta$  = effet fixe (laboratoire)
- $b_i$  = effet aléatoire (chien)
- $\varepsilon$  = valeur résiduelle =  $CV_{inter}$

Dans ce modèle, le laboratoire A a été arbitrairement choisi comme laboratoire de référence. Il y a une différence entre les laboratoires si la valeur de  $p$  est inférieure à 5%.

### *5 – Effet du laboratoire sur le dosage de la créatinine*

Comme pour l'étude de l'effet du laboratoire sur les résultats du RPCU, un test de Shapiro–Wilk indique que les données des dosages de créatinine (tout laboratoire et tout chien confondus) ne suivent pas une loi Normale ( $p = 6.282 \cdot 10^{-14}$ ). Les tests paramétriques usuels, tels qu'une ANOVA par exemple, pour étudier l'influence des laboratoires ne sont pas utilisables. C'est un test de Quade qui a été utilisé avec comme hypothèse nulle :  $H_0$  – "En tenant compte de l'éventuel effet chien, les dosages de la créatinine donnés par les laboratoires sont globalement égaux".

### *6 – Effet du laboratoire sur le dosage des protéines*

Un test de Shapiro–Wilk indique aussi que les données du dosage des protéines (tout laboratoire et tout chien confondus) ne suivent pas une loi Normale ( $p = 2.2 \cdot 10^{-16}$ ).

De nouveau, un test de Quade a été choisi pour vérifier l'hypothèse nulle :  $H_0$  – "En tenant compte de l'éventuel effet chien, les dosages des protéines donnés par les laboratoires sont globalement égaux".

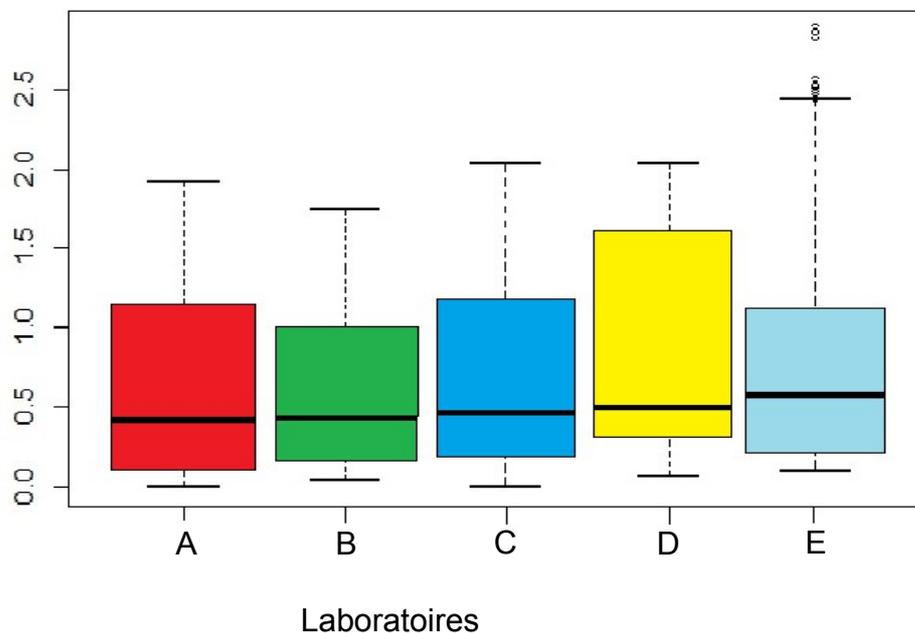
### III – Résultats

Les données se présentent sous la forme de résultats de dosage de protéines, de dosage de créatinine et de RPCU dans des urines de chien (Annexe II).

#### A – Statistiques descriptives

##### *1 – Résultats du RPCU*

En représentant en « boîtes à moustaches » les concentrations urinaires de créatinine en fonction des laboratoires, il s'avère qu'elles sont sensiblement égales en moyenne pour les laboratoires A, B, C et D, mais pas en dispersion. Le laboratoire E présente une moyenne plus élevée et de nombreux points extrêmes ou valeurs aberrantes (Figure 8).



*Figure 8. Représentation en "boîte à moustaches" des valeurs du RPCU pour chaque laboratoire.*

La distribution des dosages de RPCU en fonction du chien et du laboratoire (Figure 9), permet d'observer tout d'abord que les valeurs de RPCU pour un même chien sont assez proches, la variabilité intra-chien est faible (tableau 7). Au contraire, ces valeurs diffèrent beaucoup plus en moyenne d'un chien à l'autre (Figure 9), comme attendu pour cette étude.

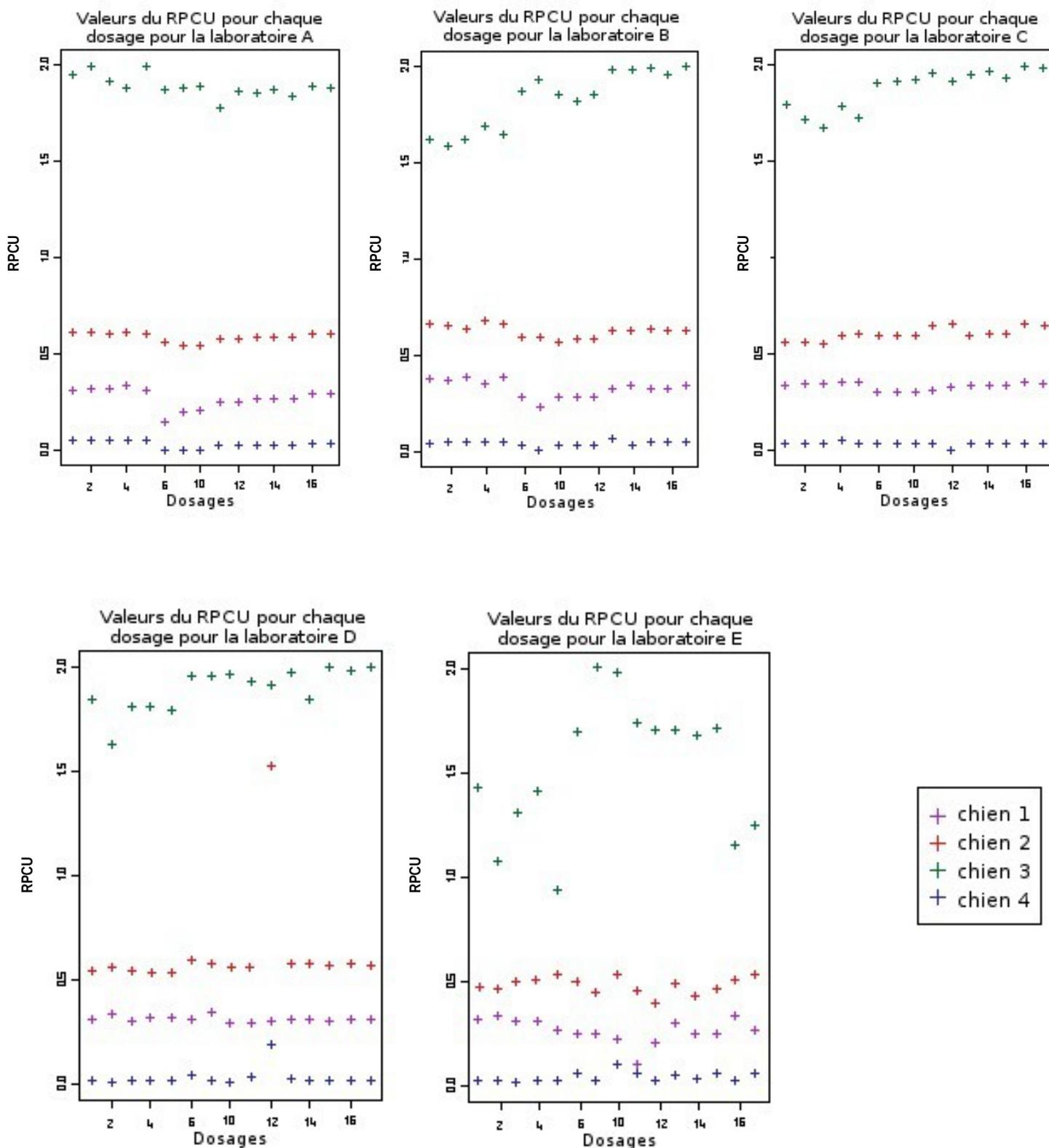


Figure 9. Représentation des valeurs de RPCU pour chaque chien et chaque laboratoire.

Une hétérogénéité du RPCU entre les 4 chiens est visible et notamment le chien 3 qui a des valeurs de RPCU en moyenne plus grandes, ce qui correspond aux valeurs attendues suite aux dilutions. A priori, il existe une grande variabilité pour le chien 3 dans le laboratoire E.

Cette représentation permet également de voir qu'un des dosages du chien 2 dans le laboratoire D semble aberrant tout comme l'une des mesures du chien 4 dans ce même laboratoire.

Tableau 7. Ecart-type (SD) et moyenne des RPCU en fonction des laboratoires.

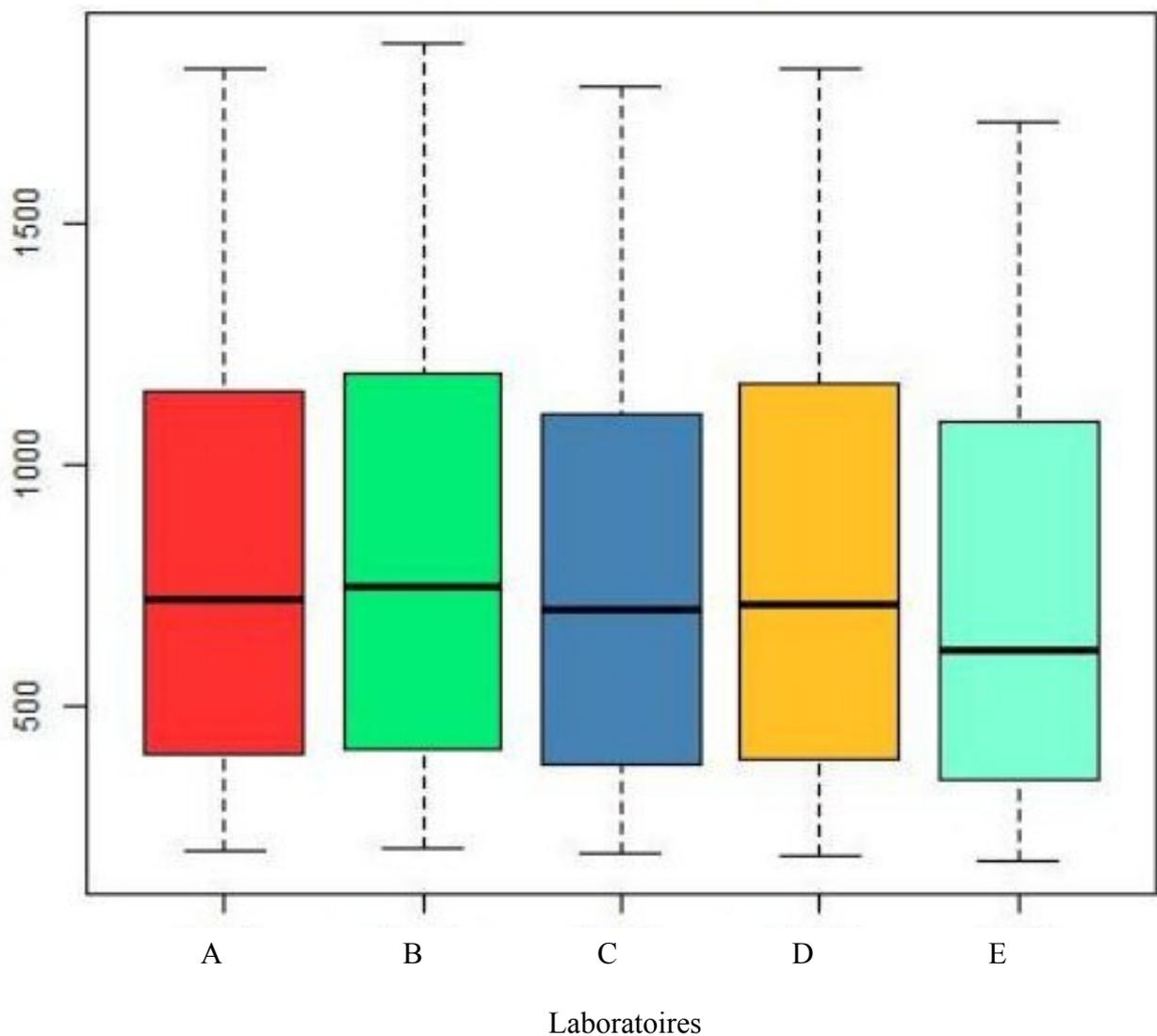
Laboratoire		A	B	C	D	E
Ecart-type	Chien 1	0.051	0.038	0.019	0.014	0.086
	Chien 2	0.023	0.028	0.032	0.244	0.081
	Chien 3	0.055	0.130	0.107	0.101	0.454
	Chien 4	0.019	0.013	0.011	0.044	0.035
Moyenne	Chien 1	0.27	0.33	0.37	0.38	0.46
	Chien 2	0.57	0.58	0.64	0.69	0.75
	Chien 3	1.87	1.58	1.93	1.93	2.21
	Chien 4	0.032	0.090	0.067	0.104	0.148

Le tableau 7 résume les moyennes des RPCU pour chaque chien et chaque laboratoire. On voit clairement que le chien 3 a en moyenne une valeur de RPCU supérieure. Si on regarde les écarts-type, on remarque également qu'en accord avec la représentation graphique, l'écart-type du RPCU pour le chien 3 dans le laboratoire E est le plus grand (SD = 0.454) mais qu'également l'écart-type du chien 2 dans le laboratoire D est important (la valeur "aberrante" fait augmenter l'hétérogénéité).

## 2 – Résultats du dosage de la créatinine

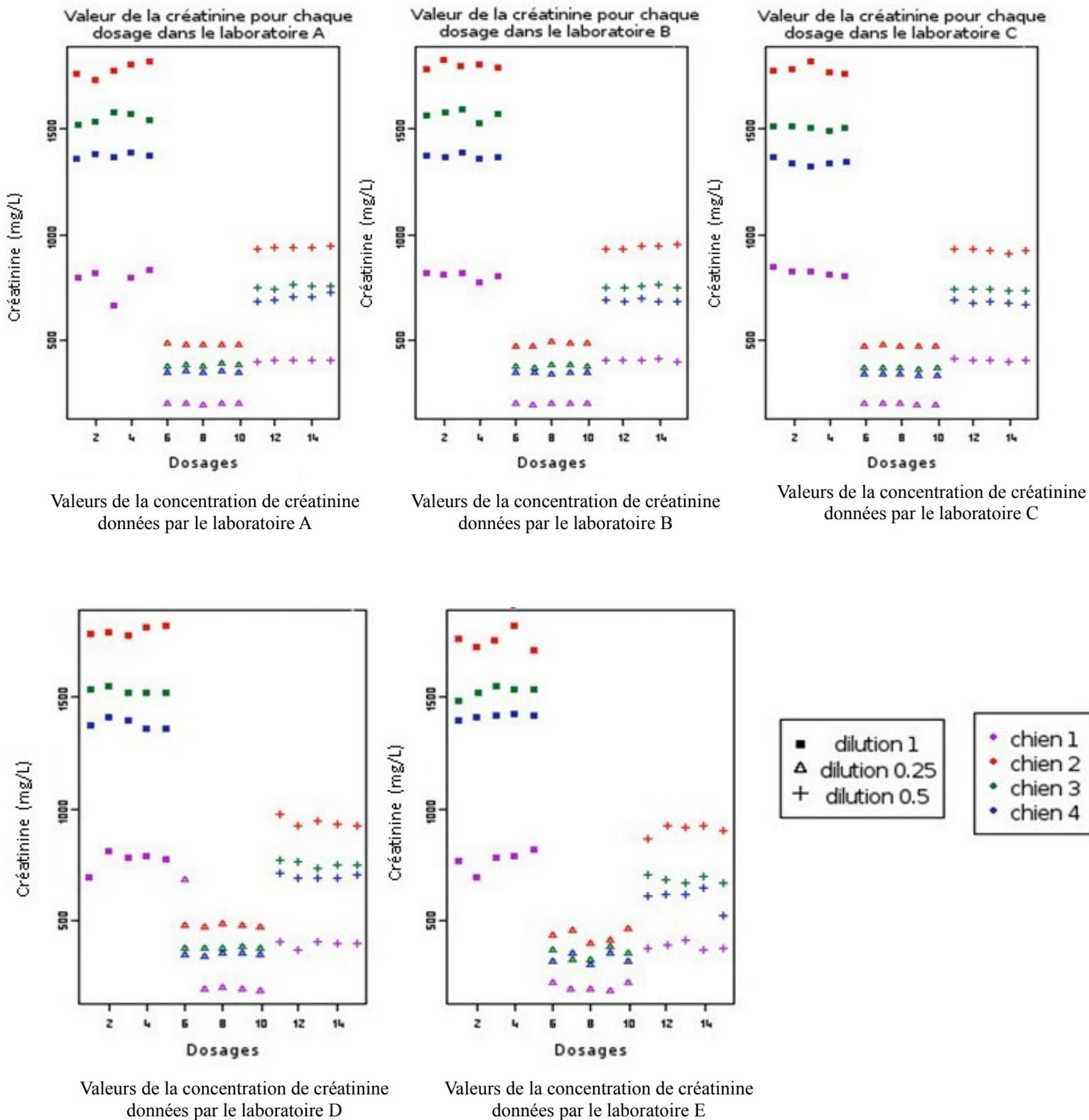
En représentant en « boîtes à moustaches » les concentrations urinaires de créatinine en fonction des laboratoires, il s'avère qu'elles sont sensiblement égales en moyenne et en dispersion (Figure 10).

Concentration urinaire de créatinine (mg/L)



On représente également les valeurs de créatinine pour chaque chien et chaque laboratoire (Figure 11). *Figure 11. Valeurs de la concentration urinaire de créatinine par laboratoire,*

*en fonction du chien et de la dilution.*



### 3 – Résultats du dosage des protéines

La représentation en « boîtes à moustaches » des concentrations de protéines dans les urines en fonction des laboratoires (Figure 12) permet de voir que les concentrations urinaires de protéines ont des médianes proches. Elle permet surtout de noter la présence de nombreuses valeurs extrêmes.

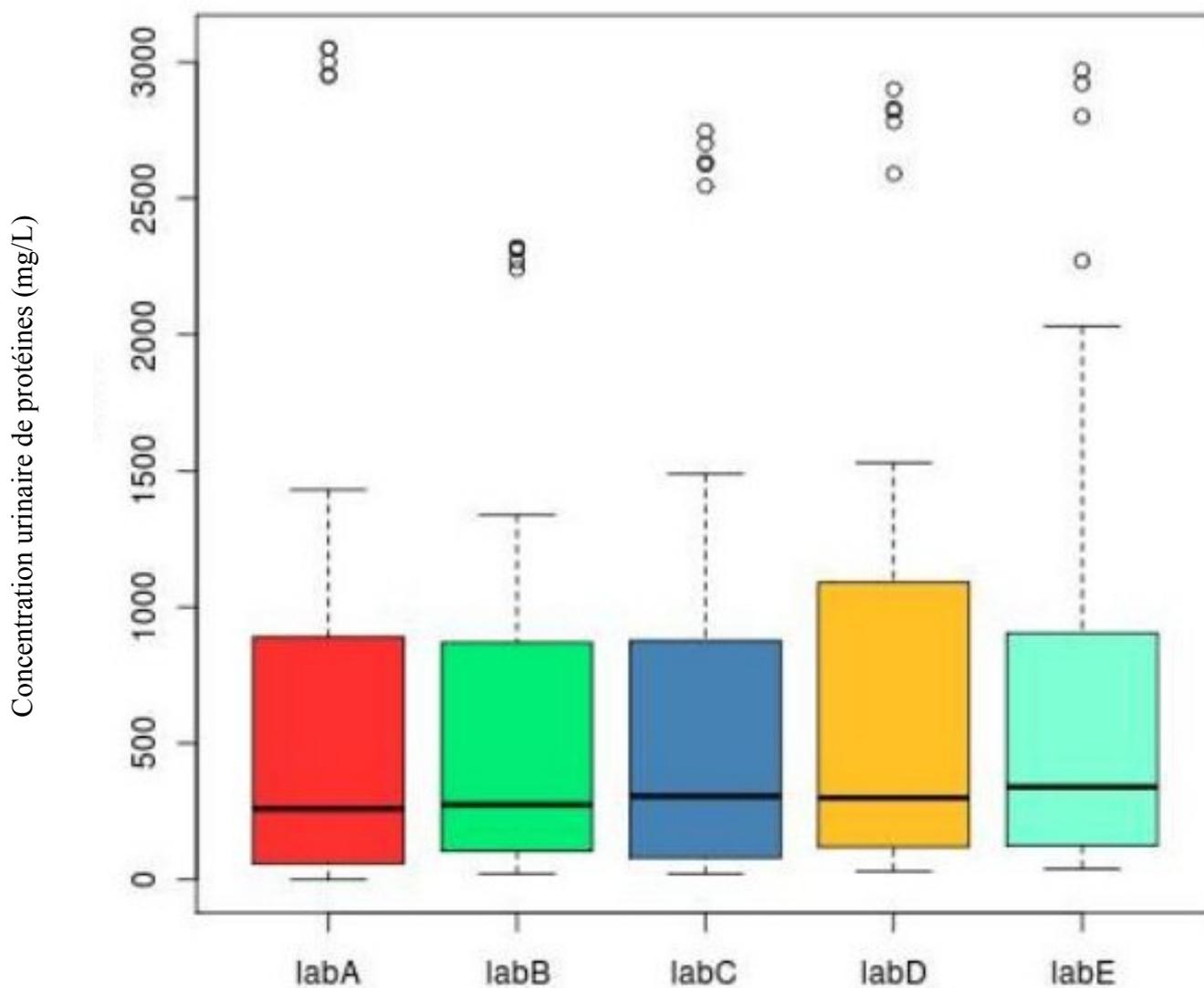


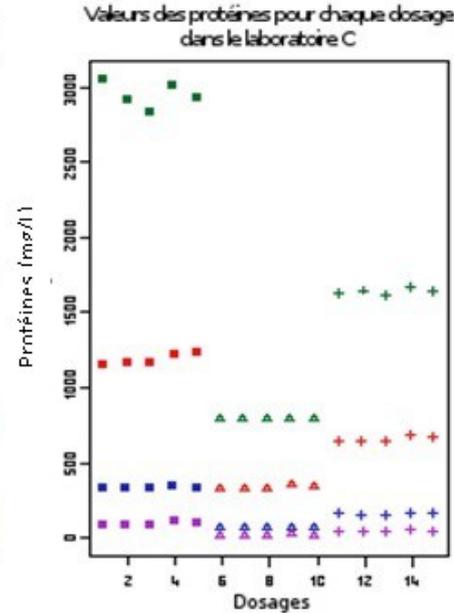
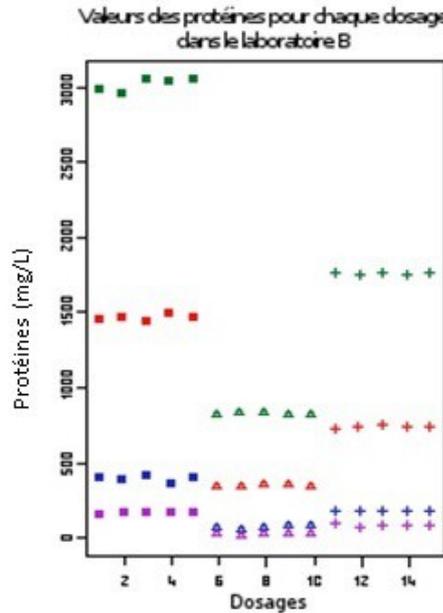
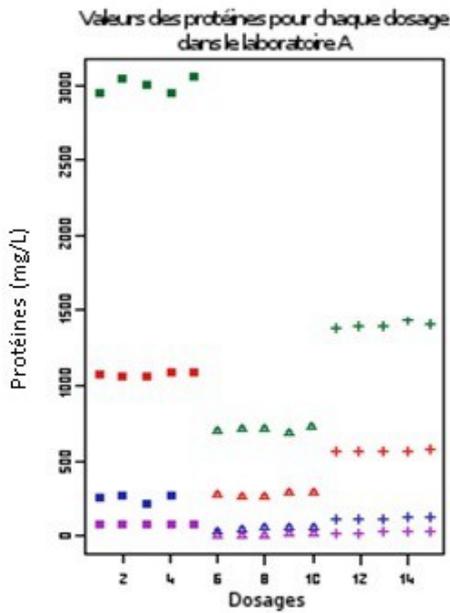
Figure 12. Représentation en "boîte à moustaches" des concentrations urinaires en protéines pour chaque laboratoire.

Les concentrations urinaires de protéines pour chaque chien et chaque laboratoire sont aussi représentées (Figure 13).

Valeurs de la concentration de protéines données par le laboratoire A

Valeurs de la concentration de protéines données par le laboratoire B

Valeurs de la concentration de protéines données par le laboratoire C



Valeurs de la concentration de protéines données par le laboratoire D

Valeurs de la concentration de protéines données par le laboratoire E

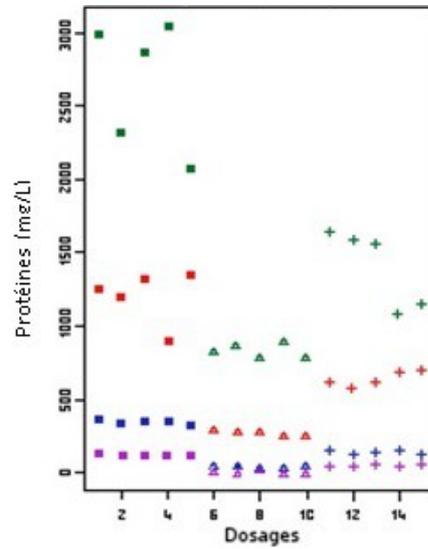
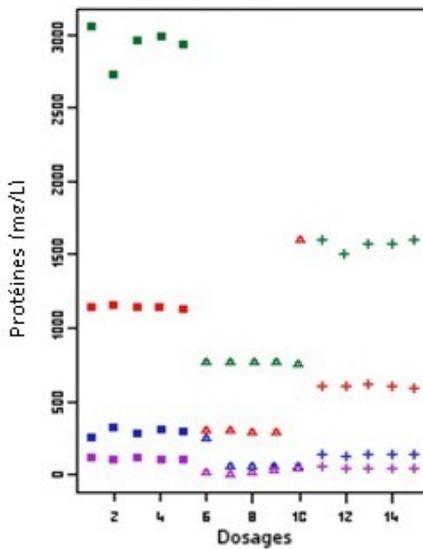


Figure 13. Valeur du dosage de la concentration urinaire de protéines par laboratoire, en fonction du chien et du laboratoire.

Une grande hétérogénéité des concentrations de protéines selon le chien (test de Bartlett significatif avec une valeur =  $2 \cdot 10^{-16}$ ) est observée, mais également selon la dilution, ce qui correspond aux résultats attendus. En outre, une dispersion plus importante des résultats est observée pour le laboratoire E.

#### *4– Détection des animaux protéinuriques*

Le tableau 8 récapitule, par laboratoire, le nombre de chiens détectés protéinuriques et non protéinuriques, et le compare à celui déterminé par notre protocole d'étude (enrichissement en protéines pour obtenir un RPCU donné).

Il permet de déterminer la capacité des laboratoires à déterminer correctement les échantillons (protéinuriques, douteux, non protéinuriques) pour chaque laboratoire, par rapport à ce qui est attendu.

Par exemple pour le laboratoire A, pour le chien 1, tous les échantillons (au nombre de 15) auraient dû être déclarés douteux, or 1 échantillon a été déclaré non protéinurique. Pour le chien 1, le laboratoire a donc détecté 93% des échantillons douteux.

		Laboratoires																							
		Références théoriques				A				B				C				D				E			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Chiens</b>		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Nombre d'échantillons non protéinuriques</b>		0	0	0	15	1	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	14	1	0	0	15
<b>Taux d'échantillons non protéinuriques, par rapport au nombre attendu</b>		0	0	0	100 %	7%	0	0	100 %	0	0	0	100 %	0	0	0	100 %	0	0	0	93 %	7%	0	0	100 %
<b>Nombre d'échantillons douteux</b>		15	0	0	0	14	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	1	8	0	0	0
<b>Taux d'échantillons douteux, par rapport au nombre attendu</b>		100 %	0	0	0	93 %	0	0	0	100 %	0	0	0	100 %	0	0	0	100 %	0	0	7%	53 %	0	0	0
<b>Nombre d'échantillons protéinuriques</b>		0	15	15	0	0	15	15	0	0	15	15	0	0	15	15	0	0	15	15	0	6	15	15	0
<b>Taux d'échantillons protéinuriques, par rapport au nombre attendu</b>		0	100 %	100 %	0 %	0	100 %	100 %	0 %	0	100 %	100 %	0 %	0	100 %	100 %	0 %	0	100 %	100 %	0 %	40 %	100 %	100 %	0 %

Tableau 8. Nombres d'échantillons non protéinuriques ( $RPCU < 0.2$ ), protéinuriques ( $RPCU > 0.5$ ) et douteux ( $0.2 \leq RPCU \leq 0.5$ ).

## B – Statistiques analytiques

### 1 – Etude du RPCU

#### a – Effet de la dilution

Les résultats sont représentés par les figures 14 à 18 : les interactions entre dilution et chien ne sont pas significatives.

La dilution n'a donc pas d'influence sur le dosage du RPCU.

```
Call:
lm(formula = dataA$RPCU ~ dataA$Dilution * dataA$Chien)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.7614 -0.4950 -0.2054  0.2300  1.2339

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      0.46700    0.49545   0.943   0.350
dataA$Dilution    0.13657    0.74905   0.182   0.856
dataA$Chien        0.06980    0.18091   0.386   0.701
dataA$Dilution:dataA$Chien -0.01897    0.27352  -0.069   0.945

Residual standard error: 0.7386 on 56 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.009972, Adjusted R-squared: -0.04306
F-statistic: 0.188 on 3 and 56 DF, p-value: 0.9041

> model_labA=lm(dataA$RPCU~as.factor(dataA$Dilution)+as.factor(dataA$Chien))
> summary(model_labA)

Call:
lm(formula = dataA$RPCU ~ as.factor(dataA$Dilution) + as.factor(dataA$Chien))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.08533 -0.01325  0.00200  0.01492  0.06900

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      0.235333    0.008964  26.254 < 2e-16 ***
as.factor(dataA$Dilution)0.5  0.033000    0.008964   3.682 0.000537 ***
as.factor(dataA$Dilution)1    0.069000    0.008964   7.698 3.04e-10 ***
as.factor(dataA$Chien)2        0.317333    0.010350  30.659 < 2e-16 ***
as.factor(dataA$Chien)3        1.616667    0.010350 156.196 < 2e-16 ***
as.factor(dataA$Chien)4       -0.237333    0.010350 -22.930 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.02835 on 54 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.9986, Adjusted R-squared: 0.9985
F-statistic: 7670 on 5 and 54 DF, p-value: < 2.2e-16
```

Figure 14. Résultats de l'ANOVA pour le laboratoire A.

```

Call:
lm(formula = dataB$RPCU ~ dataB$Dilution * dataB$Chien)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.6695 -0.3799 -0.1740  0.1759  1.0655

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      0.49200    0.39690   1.240   0.220
dataB$Dilution  0.13543    0.60006   0.226   0.822
dataB$Chien      0.06690    0.14493   0.462   0.646
dataB$Dilution:dataB$Chien -0.06394    0.21911  -0.292   0.771

Residual standard error: 0.5917 on 56 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.005025, Adjusted R-squared: -0.04828
F-statistic: 0.09427 on 3 and 56 DF, p-value: 0.9629

> model_labB=lm(dataB$RPCU~as.factor(dataB$Dilution)+as.factor(dataB$Chien))
> summary(model_labB)

Call:
lm(formula = dataB$RPCU ~ as.factor(dataB$Dilution) + as.factor(dataB$Chien))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.18267 -0.02892 -0.01117  0.04433  0.10783

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      0.31250    0.02059  15.174 < 2e-16 ***
as.factor(dataB$Dilution)0.5  0.05300    0.02059   2.574  0.0128 *
as.factor(dataB$Dilution)1  -0.00650    0.02059  -0.316  0.7535
as.factor(dataB$Chien)2      0.24867    0.02378  10.457 1.37e-14 ***
as.factor(dataB$Chien)3      1.25667    0.02378  52.845 < 2e-16 ***
as.factor(dataB$Chien)4     -0.23733    0.02378  -9.980 7.33e-14 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.06513 on 54 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.9884, Adjusted R-squared: 0.9873
F-statistic: 918.3 on 5 and 54 DF, p-value: < 2.2e-16

```

Figure 15. Résultats de l'ANOVA pour le laboratoire B.

```

Call:
lm(formula = dataC$RPCU ~ dataC$Dilution * dataC$Chien)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.8173 -0.4482 -0.2063  0.2116  1.2726

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.649500   0.493482   1.316   0.193
dataC$Dilution 0.007714   0.746074   0.010   0.992
dataC$Chien     0.056600   0.180194   0.314   0.755
dataC$Dilution:dataC$Chien -0.030514   0.272428  -0.112   0.911

Residual standard error: 0.7356 on 56 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.004831, Adjusted R-squared: -0.04848
F-statistic: 0.09062 on 3 and 56 DF, p-value: 0.965

> model_labC=lm(dataC$RPCU~as.factor(dataC$Dilution)+as.factor(dataC$Chien))
> summary(model_labC)

Call:
lm(formula = dataC$RPCU ~ as.factor(dataC$Dilution) + as.factor(dataC$Chien))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.17350 -0.02633 -0.00525  0.03983  0.09050

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.37433   0.01606  23.315 < 2e-16 ***
as.factor(dataC$Dilution)0.5  0.02250   0.01606   1.401  0.16681
as.factor(dataC$Dilution)1  -0.04350   0.01606  -2.709  0.00901 **
as.factor(dataC$Chien)2      0.27267   0.01854  14.708 < 2e-16 ***
as.factor(dataC$Chien)3      1.56267   0.01854  84.291 < 2e-16 ***
as.factor(dataC$Chien)4     -0.30067   0.01854 -16.218 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.05077 on 54 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.9954, Adjusted R-squared: 0.995
F-statistic: 2352 on 5 and 54 DF, p-value: < 2.2e-16

```

Figure 16. Résultats des ANOVA pour le laboratoire C.

```

Call:
lm(formula = dataD$RPCU ~ dataD$Dilution * dataD$Chien)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.8100 -0.4493 -0.2229  0.8137  1.2222

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)          0.7240     0.4905   1.476   0.146
dataD$Dilution      -0.0880     0.7416  -0.119   0.906
dataD$Chien           0.0514     0.1791   0.287   0.775
dataD$Dilution:dataD$Chien -0.0176     0.2708  -0.065   0.948

Residual standard error: 0.7312 on 56 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.007649,    Adjusted R-squared:  -0.04551
F-statistic: 0.1439 on 3 and 56 DF,  p-value: 0.9332

> model_labD=lm(dataD$RPCU~as.factor(dataD$Dilution)+as.factor(dataD$Chien))
> summary(model_labD)

Call:
lm(formula = dataD$RPCU ~ as.factor(dataD$Dilution) + as.factor(dataD$Chien))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.20767 -0.04833 -0.01567  0.02950  0.82867

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)          0.43200     0.04084  10.578 9.02e-15 ***
as.factor(dataD$Dilution)0.5 -0.05300     0.04084  -1.298  0.1999
as.factor(dataD$Dilution)1  -0.10300     0.04084  -2.522  0.0147 *
as.factor(dataD$Chien)2       0.30933     0.04716   6.559 2.14e-08 ***
as.factor(dataD$Chien)3       1.54867     0.04716  32.839 < 2e-16 ***
as.factor(dataD$Chien)4      -0.27600     0.04716  -5.853 2.94e-07 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.1292 on 54 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9702,    Adjusted R-squared:  0.9674
F-statistic: 351 on 5 and 54 DF,  p-value: < 2.2e-16

```

Figure 17. Résultats des ANOVA pour le laboratoire D.

```

Call:
lm(formula = dataE$RPCU ~ dataE$Dilution * dataE$Chien)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.0205 -0.5903 -0.2658  0.1756  1.8607

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      0.6465     0.5662   1.142   0.258
dataE$Dilution    0.1980     0.8560   0.231   0.818
dataE$Chien       0.1552     0.2067   0.751   0.456
dataE$Dilution:dataE$Chien -0.1763     0.3126  -0.564   0.575

Residual standard error: 0.844 on 56 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.01909,    Adjusted R-squared:  -0.03346
F-statistic: 0.3632 on 3 and 56 DF,  p-value: 0.7798

> model_labE=lm(dataE$RPCU~as.factor(dataE$Dilution)+as.factor(dataE$Chien))
> summary(model_labE)

Call:
lm(formula = dataE$RPCU ~ as.factor(dataE$Dilution) + as.factor(dataE$Chien))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.717000 -0.108667  0.003833  0.099833  0.586000

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      0.55267     0.07128   7.754 2.47e-10 ***
as.factor(dataE$Dilution)0.5 -0.08500     0.07128  -1.192 0.238282
as.factor(dataE$Dilution)1  -0.18700     0.07128  -2.623 0.011291 +
as.factor(dataE$Chien)2      0.28600     0.08231   3.475 0.001016 **
as.factor(dataE$Chien)3      1.75133     0.08231  21.278 < 2e-16 ***
as.factor(dataE$Chien)4     -0.31400     0.08231  -3.815 0.000352 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.2254 on 54 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9325,    Adjusted R-squared:  0.9263
F-statistic: 149.3 on 5 and 54 DF,  p-value: < 2.2e-16

```

Figure 18. Résultats des ANOVA pour le laboratoire E.

Pour la comparaison entre les chiens, dans ce modèle, "l'intercept" correspond au chien 1 et à une dilution au quart. Ainsi, pour le laboratoire A, pour la dilution au quart, le chien 2 a un RPCU significativement plus élevé de 0.317 que le chien 1. De même, ces résultats se lisent comme suit : pour le laboratoire A et pour le chien 1, le RPCU est en moyenne supérieure de 0.033 lorsque l'urine est diluée d'un demi par rapport à une dilution au quart.

*b – Effet du laboratoire*

Les résultats de ce test sont présentés sur la figure 19.

	labA	labB	labC	labD	labE
chien 1	0.2693333	0.3280000	0.3673333	0.3800000	0.462000
chien 2	0.5866667	0.5766667	0.6400000	0.6893333	0.748000
chien 3	1.8860000	1.5846667	1.9300000	1.9286667	2.213333
chien 4	0.0320000	0.0906667	0.0666667	0.1040000	0.148000

Quade test	
data:	moyenne_RPCU
Quade F =	7.7784, num df = 4, denom df = 12, p-value = 0.002478

*Figure 19. Données des moyennes du RPCU par laboratoire et par chien et résultat du test de Quade.*

La valeur de P du test est de 0.002478, avec un risque de première espèce de 5%. L'hypothèse H0 est rejetée : les résultats du RPCU dépendent du laboratoire. Les laboratoires donnent des résultats de RPCU différents pour un même chien.

Le résidu  $\varepsilon$  (« Residual Standard Error » surligné dans les figures 14 à 18 ) de chaque laboratoire correspond bien à la valeur de la variabilité intra-laboratoire ( $CV_{intra}$ ). Les valeurs des  $CV_{intra}$  sont récapitulées dans le tableau 9.

*Tableau 9. Valeurs des coefficients de variabilité intra-laboratoire*

	Laboratoire				
	A	B	C	D	E
$CV_{intra}$	<b>2%</b>	<b>6%</b>	<b>5%</b>	<b>13%</b>	<b>26%</b>

c – Comparaison des laboratoires pour les valeurs du RPCU

Ces résultats (Figure 20) nous indiquent que pour un même chien, il n'y a pas de différence significative entre le laboratoire B et le laboratoire A ( $p = 0.0703$ ). Pour les autres laboratoires, il y a une différence significative. De plus, les laboratoires C, D et E ont tendance à trouver des valeurs de RPCU supérieures à celles trouvées par le laboratoire A. Par exemple, les valeurs de RPCU du laboratoire E sont en moyenne supérieures de 0.199 à celles du laboratoire A.

```

Linear mixed-effects model fit by REML
Data: data
      AIC      BIC    logLik
-239.5535 -213.7446 126.7767

Random effects:
Formula: ~1 | Chien
      (Intercept)  Residual
StdDev:  0.8042935  0.1462144

Fixed effects: RPCU ~ labo
              Value Std.Error  DF   t-value p-value
(Intercept)  0.6935000  0.4025895  292   1.722598  0.0860
labolabB     -0.0485000  0.0266950  292  -1.816822  0.0703
labolabC      0.0575000  0.0266950  292   2.153964  0.0321
labolabD      0.0820000  0.0266950  292   3.071740  0.0023
labolabE      0.1993333  0.0266950  292   7.467075  0.0000

Correlation:
      (Intr) lablabB lablabC lablabD
labolabB -0.033
labolabC -0.033  0.500
labolabD -0.033  0.500  0.500
labolabE -0.033  0.500  0.500  0.500

Standardized Within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-4.4406745 -0.3287677 -0.0371957  0.2625445  6.1408997

Number of Observations: 300
Number of Groups: 4
    
```

Figure 20. Résultats du modèle à effets mixtes pour l'étude de la variabilité inter-laboratoire.

La valeur notée « Residual » dans la figure 20 correspond à  $\varepsilon$  et donc à la variabilité inter-laboratoire, soit  $CV_{\text{inter}} = 15\%$

## 2 – Effet du laboratoire sur les résultats du dosage de la créatinine

Les résultats sont présentés sur la figure 21.

	laboA	laboB	laboC	laboD	LaboE
chien1	134.67	167.33	175.27	184.67	207.33
chien2	634.00	651.33	657.20	744.00	719.33
chien3	1704.00	1420.00	1612.13	1674.67	1612.67
chien4	32.67	78.67	53.93	77.33	100.00

Quade test	
data:	Z
Quade F =	1.557, num df = 4, denom df = 12, p-value = 0.2483

Figure 21. Données des moyennes du dosage de la créatinine par laboratoire et par chien et résultat du test de Quade.

La valeur de P du test est de 0.2483, avec un risque de première espèce de 5%. L'hypothèse H0 est acceptée : les résultats du dosage de la créatinine ne dépendent pas du laboratoire.

Les laboratoires donnent des résultats de la concentration en créatinine identiques pour un même chien.

### 3 – Effet du laboratoire sur les résultats du dosage des protéines

Les résultats sont présentés par la figure 22 .

	laboA	laboB	laboC	laboD	LaboE
chien1	462.60	484.00	467.80	483.67	422.33
chien2	1065.73	1105.87	1040.27	1070.93	968.80
chien3	894.27	927.20	856.00	886.73	797.80
chien4	809.60	827.27	772.00	808.80	733.80

Quade test	
data:	Y
Quade F =	9.9496, num df = 4, denom df = 12, p-value = 0.0008672

Figure 22. Données des moyennes du dosage des protéines par laboratoire et par chien et résultat du test de Quade.

La valeur de P du test est de 0.0008672, avec un risque de première espèce de 5%. L'hypothèse H0 est rejetée : les résultats du dosage des protéines dépendent du laboratoire.

Les laboratoires donnent des résultats de la concentration urinaire de protéines différents pour un même chien.



## Discussion

Le faible nombre de données par jour obtenues pour chacune des dilutions de chaque chien ne permet pas de comparer la variabilité quotidienne inter-laboratoire des dosages. Le jour du dosage n'a donc pas été pris en compte dans la comparaison des résultats obtenus par les différents laboratoires, il n'a été donc retenu que la variabilité globale inter-laboratoire sans tenir compte au jour du dosage.

L'étude des résultats montre une variabilité intra-laboratoire inférieure à 10% pour les laboratoires A, B et C, ce qui est conforme à ce qui a été rapporté chez l'enfant<sup>50</sup>. Il n'y a pas de biais d'interprétation : les résultats sont cohérents. L'ensemble des dosages effectués ne modifie pas la conclusion quant au statut de l'animal : un chien protéinurique est déclaré protéinurique, un chien non protéinurique est détecté non protéinurique quelque soit le dosage.

La variabilité intra-laboratoire du laboratoire D est de 13%, mais il n'y a pas non plus de biais d'interprétation.

La variabilité intra-laboratoire du laboratoire E est de 25%. Il existe un biais d'interprétation clinique, par exemple pour le chien 1 : un dosage donne un RPCU de 0.54, un autre de 0.37 ou encore de 0.19. Le statut de ce chien sera donc d'un dosage sur l'autre protéinurique ou non-protéinurique.

La variabilité intra-laboratoire peut avoir plusieurs origines possibles : le technicien procédant au dosage et son l'expérience, la mise en œuvre de la méthode<sup>5, 38</sup> par ce dernier ou encore un changement du lot de réactifs<sup>27</sup>.

La variabilité inter-laboratoire est de 15% : par exemple, le chien 1 (pour la même dilution et le même jour de dosage) a un RPCU de 0.15 avec le laboratoire A, et de 0.54 avec le laboratoire E. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une variabilité inter-laboratoire suffisamment importante pour poser un problème dans la détection des chiens malades et dans leur suivi. Le chien 1 peut être déclaré protéinurique alors qu'il ne l'est pas. Les conséquences de cette erreur peuvent être lourdes à supporter pour les propriétaires du chien (mise en œuvre abusive et sans intérêt d'un traitement antiprotéinurique).

L'étude des facteurs de variation indique que la variabilité inter-laboratoire du RPCU est due à une variabilité inter-laboratoire de la mesure de la concentration urinaire de protéines. Tous les laboratoires de cette étude utilisent le Rouge de Pyrogallol. Dans la

littérature, le CV de répétabilité est de 1 à 3 %<sup>26, 46</sup> et le CV de reproductibilité est de 3 %<sup>26, 46</sup>, trois fois plus faible que la variabilité inter-laboratoire obtenue dans cette étude. D'autres facteurs de variation sont à rechercher. La variabilité inter-laboratoire de la concentration urinaire des protéines peut avoir plusieurs origines : la technique et le matériel employés<sup>38</sup> (voir tableau 6), ainsi que le fournisseur des réactifs<sup>27</sup>. La formation du personnel<sup>15-38</sup> joue également un rôle important : connaissance des manipulations à faire, des réactifs à utiliser, habitudes de travail, comme cela a déjà été mis en évidence pour le dosage de la créatinine urinaire<sup>2</sup>. La fréquence des contrôles de qualité est aussi à prendre en compte, une différence existant à ce niveau entre les laboratoires (tableau 6). Tous les laboratoires utilisent la même méthode, celle au Rouge de Pyrogallol, mais les contrôles de qualité ne sont pas les mêmes, et leur fréquence non plus.

Des biais sont à considérer pour définir les limites de l'étude. Le premier est l'ajout de protéines exogènes aux urines dans le but d'obtenir différentes concentrations de protéines urinaires. Les résultats des dosages obtenus dans cette étude peuvent ainsi être différents de ceux pouvant être obtenus avec des urines protéinuriques de chiens souffrant de néphropathie. Un deuxième biais concerne le nombre d'échantillons analysés, par exemple l'effet « jour » n'a pu être étudié.

## **Conclusions**

L'étude de la variation de la mesure du RPCU montre que le clinicien se doit de ne pas changer de laboratoire d'analyse. Il doit aussi, face à un résultat, le confronter à son examen clinique du chien, aux commémoratifs rapportés par les propriétaires et à son expérience. Les dosages urinaires doivent donc être considérés comme un simple outil d'aide au diagnostic parmi d'autres méthodes à disposition du clinicien. En cas de doute, le dosage doit être répété.

Toutefois, les laboratoires d'analyses sont, avant tout, eux-mêmes concernés : les contrôles qualité sont indispensables. Il apparaît aussi qu'un consensus sur les méthodes et techniques de dosage du RPCU serait à envisager pour standardiser les pratiques des laboratoires et garantir des résultats plus homogènes.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, **Hervé LEFEBVRE**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Laurène ANNE** intitulée « *Variabilité inter- et intra- laboratoire de la mesure du rapport protéines sur créatinine urinaires chez le chien.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

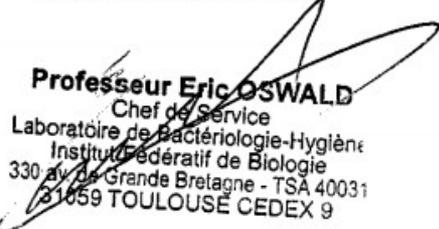


Fait à Toulouse, le 8 juin 2015  
Professeur **Hervé LEFEBVRE**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
**Isabelle CHMEEU LIN**



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur **Éric OSWALD**

  
**Professeur Eric OSWALD**  
Chef de Service  
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène  
Institut Fédératif de Biologie  
330 av. de Grande Bretagne - TSA 40031  
31059 TOULOUSE CEDEX 9

Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université

  
**Paul Sabatier**  
Professeur **Bertrand MONTHUBERT**  
Par déléation, la Vice-Présidente du CEVU  
Madame Régine **ANDRÉ OBRECHT**



**Melle Laurène ANNE**  
a été admis(e) sur concours en : 2004  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 15 mai 2008  
a validé son année d'approfondissement le : 8 octobre 2009  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

## **Bibliographie**

- [1] AMICO G (1991). Clinical factors in progressive renal injury. The role of proteinuria. *American Journal of Kidney Diseases*, **17**, 48–52.
- [2] BACON L, PARDUE H.L (1991). Predictive, error–compensating kinetic method for enzymatic quantification of creatinine in serum. *Clinical Chemistry*, **37**, 1338–1344.
- [3] BARSANTI J.A, FINCO D.R (1979). Protein concentration in urine of normal dog. *American Journal of Veterinary Research*, **40**, 1583–1588.
- [4] BIEWENGA W.J, GRUYS, E, HENDRIKS, H.J (1982). Urinary protein loss in the dog: nephrological study of 29 dogs without signs of renal disease. *Research in Veterinary Science*, **33**, 366–374
- [5] BIEWENGA W.J, GRUYS E, (1986). Proteinuria in the dog: a clinicopathological study in 51 proteinuric dogs. *Research in Veterinary Science*, **41**, 257–264
- [6] BOUKHIRA A, VIGEZZI J.F, RAULT J.P, RAMIREZ J, CLERC Y (2000). Measurement of urinary proteins with spectro-reflectometric method with Upro Vitros plates with pyrocatechol violet: absence of interference of placement replacement therapy. *Annales de Biochimie Clinique (Paris)*, **58**, 516
- [7] CARSTENSEN A, NAGEL R (1993). Development and evaluation of reagent carrier with a new reaction sequence for the determination of creatinine in blood, plasma, serum and urine. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **31**, 335–346.
- [8] CENTER S.A, WILKINSON E, ERB H, LEWIS R.M (1985). 24–hour urine protein/creatinine ration in dogs with protein–losing nephropathies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **187**, 820–824.
- [9] DELACOUR H, DAMI A, GIDENNE S, VIGEZZI J.F, LE REST N, RAMIREZ J (2003). Drug interference with the determination of urinary proteins with pyrocatechol violet Upro Vitros slides. *Annales de Biochimie Clinique (Paris)*, **61**, 709–712

- [10] DIBARTOLA S.P, CHEW D.J, JACOBS G (1980). Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **16**, 537–546.
- [11] DOETSH K, GADSDEN R.H (1997). Determination of urinary protein by use of gel filtration and a modified biuret method. Selected method. *Clinical Chemistry*, **8**, 179–192.
- [12] EKELUND S, PABY P (1991). High-performance liquid chromatographic determination of creatinine. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **51**, 67–71.
- [13] FORTERRE S, RAILA J, SCHWEIGERT F (2004). Protein profiling of urine from dogs with disease using ProteinChip analysis. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, **16**, 271–277.
- [14] FUJITA Y, MORI I, KITANO S (1984). Determination of proteins by using the color reaction with pyrocatechol violet-molybdenum (VI) complex. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **32**, 4161-4164
- [15] GIORI L, TRICOMI F.M, ZATELLI A, ROURA X, PALTRINIERI S (2011). High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis on urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, **23**, 682–690.
- [16] GOREN M.P, LI J.T (1986). The Coomassie brilliant blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria. *Clinical Chemistry*, **32**, 386–388.
- [17] GRAUER F, THOMAS C.B, EICKER S (1985). Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample. *American Journal of Veterinary Research*, **46**, 2116–2119.
- [18] GRAUER G.F, GRECO D.S, GETZY D.M, COWGILL L.D, VADEN S.L, CHEW D.J, POLZIN D.J, BARSANTI J.A (2000). Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **14**, 526–533.

- [19] GRAUER G.F (2011). Proteinuria : measurement and interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, **26**, 121–127.
- [20] GUY J.M, LEGG E.F (1990). An improved cation exchange HPLC method for the measurement of serum creatinine. *Annals of Clinical Biochemistry*, **27**, 223–226.
- [21] International Renal Interest Society. *International Renal Interest Society* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.iris-kidney.com> (consulté le 08/08/2014).
- [22] IWATA J, NISHIKAZE O (1979). New microturbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clinical Chemistry*, **25**, 1317–1319.
- [23] JACOB F, POLZIN D.J, OSBORNE C.A, NEATON J.D, KIRK C.A, ALLEN T.A (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **226**, 393–400.
- [24] LANE, I.F., SHAW, D.H., BURTON, S.A., DONALD A.W (2000). Quantitative urinalysis in healthy Beagle puppies from 9 to 27 weeks of age. *American Journal of Veterinary Research*, **61**, 577–581
- [25] LAROUTE V, CHETBOUL V, ROCHE L, MAUREY C , COSTES G, POUCHELON J–L, DE LA FARGE F, BOUSSOUF M, LEFEBVRE H.P (2005). Quantitative evaluation of renal function in healthy Beagle puppies and mature dogs. *Research in Veterinary Science*, **79**, 161–167.
- [26] LE BRICON T, ERLICH D, DUSSAUCY M, GARNIER J–P, BOUSQUET B (1998). Dosage des protéines urinaires totales. Etude comparatives des techniques automatisées à l'acide trichloracétique et au rouge de pyrogallol pour les échantillons contenant des chaînes légères monoclonales. *Annales de Biologie Clinique*, **56**, 719–723.
- [27] LE BRICON T (2001). Exploration biologique de la protéinurie au laboratoire d'analyse : aspects quantitatifs. *Annales de Biologie Clinique*, **59**, 701–715.

- [28] LE BRICON T (2002). Identification et dosage des protéines urinaires au laboratoire d'analyse. *Annales de Biologie Clinique*, **60**, 525–540.
- [29] LEES G.E (2004). Early diagnosis of renal disease and renal failure. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, **34**, 867–885.
- [30] LEES G.E, BROWN S.A, ELIOTT J, GRAUER G.A, VALLEN S.L (2005). Assessment and management of proteinuria in dogs and cats : 2004 ACVIM Forum Consensus statement (small animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **19**, 377–385.
- [31] LEFEVRE G, BLOCH S, LE BRICON T, BILLIER S, ARIEN S, CAPEAU J (2001). Influence of protein composition on total urinary protein determined by pyrocatechol-violet (UPRO vitros) and pyrogallol red dye binding methods. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **15**, 40-42
- [32] MCCAWE D.L, KANPP D.W, HEWETT J.E (1985). Effect of collection time and exercise restriction on the prediction of urine protein excretion, using urine protein/creatinine ratio in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **46**, 1665–1669.
- [33] MCELDERY L.A, TARBIT I.F, CASSELLS SMITH A.J (1982). Six methods for urinary protein compared. *Clinical Chemistry*, **28**, 356–360.
- [34] MOORE F.M, BRUM S.L, BROWN L (1991). Urine protein determination in dogs and cats: comparison of dipstick and sulfasalicylic acid procedures. *Veterinary Clinical Pathology*, **20**, 95–97.
- [35] NABITY M.B, BOGGESS M.M, KASHTAN C.E, LEES G.E (2007). Day-to-day variation of the urine protein:creatinine ratio in female dogs with stable glomerular proteinuria caused by X-linked hereditary nephropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **21**, 425–430.
- [36] PAQUIGNON A, TRAN G, PROVOST J (1993). Evaluation of the Clinitek 200 urinary test strip reader analysis of dog and rat urines in pre-clinical toxicology studies. *Laboratory Animals*, **27**, 240–246.

[37] ROSSI G, GIORI L, CAMPAGNOLA S, ZATELLI A , ZINI E, PALTRINIERI S (2012). Evaluation of factors that affect analytic variability of urine protein-to-creatinine ratio determination in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **73** : **6**, 779–788.

[38] Société Française de Biologie Clinique (1993). Rapport ISSN 0757–939X. *Agence du Médicament, Annales du Contrôle de Qualité National Biochimie* [En ligne]. Disponible sur : <http://www.ansm.sante.fr> (consulté le 08/08/2014)

[39] SPENCER K (1986). Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. *Annals of Clinical Biochemistry*, **23**, 1–25.

[40] SPIERTO F.W, HANNON W.H, GUNTER E.W, SMITH S.J (1997). Stability of urine creatinine. *Clinica Chimica Acta*, **264**, 227–232.

[41] TANGANELLIE E, PRENCIPE L, BASSI D, CAMBIAGHI S, MURADORE E (1982). Enzymatic assay of creatinine in serum and urine with creatinine iminohydrolase and glutamate dehydrogenase. *Clinical Chemistry*, **28**, 1461–1464.

[42] TENCER J, THYSELL H, ANDERSSON K, GRUBB A (1997). Long-term stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-chain immunoreactivity, orosomuroid and alpha 1-antitrypsin in urine stored at –20 degrees C. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, **31**, 67–71.

[43] TRYGGVASON K, PETTERSSON E (2003). Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *Journal of Internal Medicine*, **254**, 216–224.

[44] VASSAULT A. *Protéines urinaires* [en ligne]. Disponible sur : <http://bioch.ap-hop-paris.fr/analyses/Bioforma/Proteine%20urinaire.htm> (consulté le 08/08/2014).

[45] WALLER K.V, MAHAN K.M, WISMATT D.K (1989). Current concepts in proteinuria. *Clinical Chemistry*, **35**, 755–765.

- [46] WATANABE N, KAMEI S, OKHUBO A, YAMANAKA M, OHSAWA S, MAKINO K, TOKUDA K (1986). Urinary protein as measured with a pyrogallol red molybdate complex, manually and in Hitachi 736 automated analyzer. *Clinical Chemistry*, **32**, 1551–1554.
- [47] WEBBER J.A, ZANTAN A.P (1991). Interferences in current methods for measurement of creatinine. *Clinical Chemistry*, **37**, 695–700.
- [48] WHITE J.V, OLIVIER N.B, REIMANN K, JOHNSON C (1984). Use of protein-to-creatinine ratio in a single urine specimen for quantitative estimation of canine proteinuria. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **185**, 882–885.
- [49] WILSON, D.M, ANDERSON, R.L (1993). Protein–osmolality ratio for the quantitative assessment of proteinuria from a random urinalysis sample. *American Journal of Clinical Pathology*, **100**, 419–424.
- [50] YOSHIMOTO M, TSUKAHARA H, SAITO M, HARUKI S, FUJISAWA S, SUDO M (1990). Variability of proteinuria indices. *Pediatric Nephrology*, **4**, 136-9.
- [51] YOSHIOKA T, SHIRAGA H, YOSHIDA Y, FOGO A, DEEN W.M, HOYER J.R, ICHIKAXA I (1988). “Intact nephrons” as primary origin of proteinuria in chronic renal disease. *Journal of Clinical Investigation*, **82**, 1614–1623.
- [52] ZATELLI A, PALTRINIERI S, NIZI F, ROURA X, ZINI E (2010). Evaluation of a urine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **71**, 235–240
- [53] ZHIRIA A, HOUOT O, WELLMAN–BEDNAWSKA, SIEST G (1985). Simultaneous determination of uric acid and creatinine in plasma by reversed–phase liquid chromatography. *Clinical Chemistry*, **31**, 109–112

## Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	11
<i>Liste des tableaux et des illustrations</i>	12
<b>Introduction</b>	15
<b>Partie bibliographie : le rapport protéines sur créatinine urinaires</b>	17
I – Définitions	19
A – Protéinurie	19
B – Rapport protéines sur créatinine urinaires	19
II – Dosages des protéines et de la créatinine dans les urines	21
A – Mesure de la concentration urinaire en protéines	21
1 – Méthode de référence	21
2 – Méthodes colorimétriques	21
a – Méthode du biuret	21
b – Technique au Rouge de Pyrogallol	23
c – Coloration au Bleu de Coomassie	24
d – Coloration au Violet de Pyrocatéchol	25
3 – Méthodes turbidimétriques	26
4 – Autres méthodes	26
a – Bandelette réactive	26
b – Electrophorèse	27
5 – Données métrologiques des méthodes colorimétriques et turbidimétriques (chez l'Homme)	27
B – Mesure de la concentration urinaire en créatinine	28
1 – Méthode colorimétrique : méthode de Jaffé	28
2 – Techniques enzymatiques	29
a – Utilisant la créatinine aminohydrolase	29
b – Utilisant la créatinine désaminase	30
3 – Techniques chromatographiques	31
4 – Données métrologiques (chez l'Homme)	31
a – Domaine de mesure	31
b – Reproductibilité	31
C – Conservation des urines	32

III – La protéinurie chez le chien	33
A – Les protéines normalement présentes	33
B – Causes	35
1 – Les protéinuries fonctionnelles	35
2 – Les protéinuries pathologiques	35
C – Conséquences	36
D – Implications cliniques	37
IV – Utilisation du rapport protéines sur créatinine urinaires	37
A – Interprétation	37
B – Contexte d'utilisation	38
C – Suivi du RPCU en thérapeutique	39

**Partie expérimentale : étude de la variabilité inter- et intra-laboratoire de la mesure du rapport protéines sur créatinine urinaires** 41

I – Problématique et objectifs	43
II – Matériels et méthodes	43
A – Laboratoires	43
B – Préparation des spécimens d'urines	44
C – Source animale des urines et des protéines	44
D – Obtention des urines	45
E – Enrichissement des urines	45
1 – Obtention des protéines sériques	45
2 – Détermination du volume de sérum à ajouter	45
F – Préparation des échantillons	46
1 – Dilution	46
2 – Echantillonnage	46
3 – Envoi aux laboratoires	47
G – Dosage des échantillons	47
1 – Déroulement des dosages	47
2 – Méthodes de dosage	47
H – Modèle statistique	49
1 – Statistiques descriptives	49
2 – Effet de la dilution sur le RPCU	49
3 – Effet du laboratoire sur le RPCU	50
4 – Comparaison interlaboratoire pour le RPCU	50
5 – Effet du laboratoire sur le dosage de la créatinine	51

6 – Effet du laboratoire sur le dosage des protéines	51
III – Résultats	52
A – Statistiques descriptives	52
1 – Résultats du RPCU	52
2 – Résultats du dosage de la créatinine	55
3 – Résultats du dosage des protéines	57
4 – Détection des animaux protéinuriques	59
B – Statistiques analytiques	61
1 – Etude du RPCU	61
a – Effet de la dilution	61
b – Effet du laboratoire	66
c – Comparaison des laboratoires	67
2 – Effet du laboratoire sur les résultats du dosage de la créatinine	68
3 – Effet du laboratoire sur les résultats du dosage des protéines	69
 <b>Discussion</b>	 71
 <b>Conclusions</b>	 73
 <i>Références bibliographiques</i>	 75
<i>Table des matières</i>	81
<i>Annexes</i>	85



## Annexes

### Annexe I

#### A – Détermination du volume de sang à prélever

Il faut partir d'hypothèses puisque la quantité de protéines dans les urines et dans le sérum utilisé sont inconnus.

Le sérum représente environ 45% du volume sanguin, et la concentration moyenne est de 70 g/L [\*].

La protéinurie moyenne chez un chien sain est d'environ 0.2 g/L<sup>9</sup>.

	Protéines		Créatinine	
	g/L	RPCU	g/L	µmol/L
<b>dans des urines saines</b>	0.2	0.12	1.695	15000
<b>ce qu'on désire</b>	1	0.59		
	1.5	0.88		
	3.5	2.06		

Exemple : pour obtenir un RPCU aux alentours de 0,6 :

<b>Concentration sérum</b>	70 g/L	
	70 mg/mL	
<b>Protéines à rajouter</b>	800 mg	dans 1 L
	400 mg	dans 500 mL
<b>Volume à ajouter</b>	<b>5.7 mL</b>	dans 500 mL

Suivant ce calcul, il faut donc un volume de sérum de 6 mL à 500 mL d'urine pour obtenir un RPCU aux environs de 0.6, à partir des urines d'un chien sain, 14 mL pour obtenir un RPCU d'environ 0.9, et 50 mL pour un RPCU autour de 2. La quantité totale de sérum à prélever dans ces conditions est de 70 mL.

Donc quantité totale de sang à prélever pour enrichir les urines est de **155 mL**

[\*]CARR M.H, SCHLOERB P.R (1959). Blood components in the dog: normal values. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **53** : 4, 646-652

## B – Détermination de la quantité de protéines à ajouter

Les protéines dans les échantillons d'urines ont été dosées avec la méthode au Rouge de Pyrogallol, la créatinine a été dosée par une méthode enzymatique :

	<b>Protéines</b> g/L	<b>Créatinine</b> μmol/L	<b>Créatinine</b> g/L	<b>RPCU</b> désiré	<b>Protéines</b> nécessaires g/L
<b>Chien 1</b>	0,06	4488	0,51	0,5	0,26
<b>Chien 2</b>	0,114	9623	1,09	1	1,11
<b>Chien 3</b>	0,241	14100	1,59	2	3,24
<b>Chien 4</b>	0,171	11850	1,34		

On peut ainsi déterminer la quantité de protéines à ajouter dans les 500 mL d'urine pour avoir le RPCU recherché :

Chien 1 : **0,13 g**, soit **130 mg**

Chien 2 : **0,56 g**, soit **560 mg**

Chien 3 : **1,62 g**, soit **1620 mg**

## C – Détermination du volume de sérum à ajouter

La quantité de protéines dans le sérum est de **55 g/L**

Chien 1 :

<b>Concentration sérum</b>	55 g/L	
	55 mg/mL	
<b>Protéines à ajouter</b>	260 mg	dans 1 L
	130 mg	dans 500 mL
<b>Volume à ajouter</b>	<b>2.6 mL</b>	dans 500 mL

Chien 2 :

<b>Concentration sérum</b>	55 g/L	
	55 mg/mL	
<b>Protéines à ajouter</b>	1120 mg	dans 1 L
	560 mg	dans 500 mL
<b>Volume à ajouter</b>	<b>10.1 mL</b>	dans 500 mL

Chien 3 :

<b>Concentration sérum</b>	55 g/L	
	55 mg/mL	
<b>Protéines à ajouter</b>	3240 mg	dans 1 L
	1620 mg	dans 500 mL
<b>Volume à ajouter</b>	<b>29.5 mL</b>	dans 500 mL

## Annexe II

TABLEAU A : Résultats des dosages de protéinurie et de créatinurie effectués par le laboratoire A

Numéro d'échantillon	Chien	Jour	Dilution	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU
1	1	1	1	799	250	0.31
2	1	1	1	824	260	0.32
3	1	1	1	664	210	0.32
4	1	2	1	795	260	0.33
5	1	2	1	827	260	0.31
6	1	1	1/4	201	30	0.15
7	1	1	1/4	197	40	0.2
8	1	1	1/4	195	40	0.21
9	1	2	1/4	202	50	0.25
10	1	2	1/4	202	50	0.25
11	1	1	1/2	402	110	0.27
12	1	1	1/2	408	110	0.27
13	1	1	1/2	408	110	0.27
14	1	2	1/2	408	120	0.29
15	1	2	1/2	407	120	0.29
16	2	1	1	1762	1070	0.61
17	2	1	1	1735	1060	0.61
18	2	1	1	1770	1070	0.6
19	2	2	1	1797	1090	0.61
20	2	2	1	1822	1090	0.6
21	2	1	1/4	485	270	0.56
22	2	1	1/4	479	260	0.54
23	2	1	1/4	480	260	0.54
24	2	2	1/4	481	280	0.58
25	2	2	1/4	481	280	0.58
26	2	1	1/2	932	550	0.59
27	2	1	1/2	938	550	0.59
28	2	1	1/2	939	550	0.59
29	2	2	1/2	938	560	0.6
30	2	2	1/2	947	570	0.6
31	3	1	1	1519	2950	1.94
32	3	1	1	1533	3050	1.99
33	3	1	1	1573	3000	1.91
34	3	2	1	1570	2950	1.88
35	3	2	1	1542	3050	1.98
36	3	1	1/4	375	700	1.87
37	3	1	1/4	378	710	1.88
38	3	1	1/4	376	710	1.89
39	3	2	1/4	390	690	1.77
40	3	2	1/4	387	720	1.86
41	3	1	1/2	750	1390	1.85
42	3	1	1/2	745	1390	1.87
43	3	1	1/2	763	1400	1.83
44	3	2	1/2	757	1430	1.89
45	3	2	1/2	756	1420	1.89
46	4	1	1	1360	70	0.05
47	4	1	1	1382	70	0.05
48	4	1	1	1368	70	0.05
49	4	2	1	1384	70	0.05
50	4	2	1	1370	70	0.05
51	4	1	1/4	350	0	0,00
52	4	1	1/4	348	0	0,00
53	4	1	1/4	348	0	0,00
54	4	2	1/4	359	10	0.03
55	4	2	1/4	351	10	0.03
56	4	1	1/2	683	20	0.03
57	4	1	1/2	689	20	0.03
58	4	1	1/2	707	20	0.03
59	4	2	1/2	711	30	0.04
60	4	2	1/2	734	30	0.04

TABLEAU B : Résultats des dosages de protéinurie et de créatinurie effectués par le laboratoire B

Numéro d'échantillon	Chien	Jour	Dilution	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU
1	1	1	1	842	310	0.37
2	1	1	1	836	300	0.36
3	1	1	1	838	320	0.38
4	1	2	1	798	280	0.35
5	1	2	1	825	310	0.38
6	1	1	1/4	206	60	0.29
7	1	1	1/4	202	50	0.25
8	1	1	1/4	206	60	0.29
9	1	2	1/4	209	60	0.29
10	1	2	1/4	207	60	0.29
11	1	1	1/2	420	140	0.33
12	1	1	1/2	416	140	0.34
13	1	1	1/2	418	140	0.33
14	1	2	1/2	423	140	0.33
15	1	2	1/2	414	140	0.34
16	2	1	1	1829	1110	0.61
17	2	1	1	1875	1120	0.6
18	2	1	1	1853	1100	0.59
19	2	2	1	1851	1140	0.62
20	2	2	1	1840	1120	0.61
21	2	1	1/4	490	270	0.55
22	2	1	1/4	488	270	0.55
23	2	1	1/4	509	270	0.53
24	2	2	1/4	499	270	0.54
25	2	2	1/4	501	270	0.54
26	2	1	1/2	961	560	0.58
27	2	1	1/2	963	560	0.58
28	2	1	1/2	975	580	0.59
29	2	2	1/2	973	560	0.58
30	2	2	1/2	981	570	0.58
31	3	1	1	1605	2270	1.41
32	3	1	1	1622	2240	1.38
33	3	1	1	1640	2320	1.41
34	3	2	1	1575	2310	1.47
35	3	2	1	1618	2320	1.43
36	3	1	1/4	388	630	1.63
37	3	1	1/4	383	640	1.67
38	3	1	1/4	397	640	1.61
39	3	2	1/4	400	630	1.57
40	3	2	1/4	392	630	1.61
41	3	1	1/2	774	1330	1.72
42	3	1	1/2	773	1330	1.72
43	3	1	1/2	780	1340	1.72
44	3	2	1/2	786	1330	1.9
45	3	2	1/2	775	1340	1.73
46	4	1	1	1414	130	0.09
47	4	1	1	1408	140	0.1
48	4	1	1	1431	140	0.1
49	4	2	1	1400	140	0.1
50	4	2	1	1408	140	0.1
51	4	1	1/4	356	30	0.08
52	4	1	1/4	363	20	0.06
53	4	1	1/4	354	30	0.08
54	4	2	1/4	360	30	0.08
55	4	2	1/4	360	30	0.08
56	4	1	1/2	712	80	0.11
57	4	1	1/2	706	60	0.08
58	4	1	1/2	721	70	0.1
59	4	2	1/2	707	70	0.1
60	4	2	1/2	709	70	0.1

TABLEAU C : Résultats des dosages de protéinurie et de créatinurie effectués par le laboratoire C

Numéro d'échantillon	Chien	Jour	Dilution	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU
1	1	1	1	829	302.7	0.36
2	1	1	1	809	304.9	0.38
3	1	1	1	808	307	0.38
4	1	2	1	796	311.9	0.39
5	1	2	1	793	308	0.39
6	1	1	1/4	197	66.9	0.34
7	1	1	1/4	200	66.1	0.33
8	1	1	1/4	199	66.8	0.34
9	1	2	1/4	195	68.6	0.35
10	1	2	1/4	194	70.4	0.36
11	1	1	1/2	403	151.2	0.37
12	1	1	1/2	399	148.5	0.37
13	1	1	1/2	399	146.8	0.37
14	1	2	1/2	394	154.2	0.39
15	1	2	1/2	402	153.9	0.38
16	2	1	1	1736	1037.1	0.6
17	2	1	1	1748	1056.1	0.6
18	2	1	1	1787	1057.7	0.59
19	2	2	1	1740	1099.1	0.63
20	2	2	1	1727	1107.9	0.64
21	2	1	1/4	468	296.5	0.63
22	2	1	1/4	468	295.5	0.63
23	2	1	1/4	470	296.3	0.63
24	2	2	1/4	463	317	0.68
25	2	2	1/4	462	317.8	0.69
26	2	1	1/2	914	579.3	0.63
27	2	1	1/2	918	587	0.64
28	2	1	1/2	904	580.1	0.64
29	2	2	1/2	893	616.9	0.69
30	2	2	1/2	906	612.9	0.68
31	3	1	1	1483	2745.8	1.72
32	3	1	1	1484	2623.2	1.77
33	3	1	1	1478	2545	1.72
34	3	2	1	1464	2700	1.84
35	3	2	1	1478	2634	1.78
36	3	1	1/4	364	713.4	1.96
37	3	1	1/4	364	717.1	1.97
38	3	1	1/4	362	716.8	1.98
39	3	2	1/4	357	717.6	2.01
40	3	2	1/4	363	715.1	1.97
41	3	1	1/2	732	1462.4	2.00
42	3	1	1/2	731	1475.8	2.02
43	3	1	1/2	728	1449.3	1.99
44	3	2	1/2	727	1488	2.05
45	3	2	1/2	725	1479.3	2.04
46	4	1	1	1336	89.9	0.07
47	4	1	1	1309	92.9	0.07
48	4	1	1	1298	90.2	0.07
49	4	2	1	1306	99.4	0.08
50	4	2	1	1322	97.5	0.07
51	4	1	1/4	335	20	0.06
52	4	1	1/4	337	20.7	0.06
53	4	1	1/4	338	22.7	0.07
54	4	2	1/4	331	23.9	0.07
55	4	2	1/4	331	22	0.07
56	4	1	1/2	676	43.6	0.06
57	4	1	1/2	667	43.9	0.07
58	4	1	1/2	671	44.1	0.07
59	4	2	1/2	662	49	0.07
60	4	2	1/2	661	48.3	0.07

TABLEAU D : Résultats des dosages de protéinurie et de créatinurie effectués par le laboratoire D

Numéro d'échantillon	Chien	Jour	Dilution	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU
1	1	1	1	686	260	0.38
2	1	1	1	806	320	0.4
3	1	1	1	786	290	0.37
4	1	2	1	790	310	0.39
5	1	2	1	771	300	0.39
6	1	1	1/4	686	260	0.38
7	1	1	1/4	193	80	0.41
8	1	1	1/4	195	70	0.36
9	1	2	1/4	192	70	0.36
10	1	2	1/4	187	70	0.37
11	1	1	1/2	400	150	0.38
12	1	1	1/2	366	140	0.38
13	1	1	1/2	401	150	0.37
14	1	2	1/2	398	150	0.38
15	1	2	1/2	398	150	0.38
16	2	1	1	1791	1100	0.61
17	2	1	1	1796	1110	0.62
18	2	1	1	1778	1090	0.61
19	2	2	1	1817	1090	0.6
20	2	2	1	1824	1090	0.6
21	2	1	1/4	472	310	0.66
22	2	1	1/4	471	300	0.64
23	2	1	1/4	478	300	0.63
24	2	2	1/4	470	290	0.62
25	2	1	1/2	973	590	0.61
26	2	1	1/2	923	590	0.64
27	2	1	1/2	950	600	0.63
28	2	2	1/2	929	590	0.64
29	2	2	1/2	924	580	0.63
30	3	1	1	1544	2900	1.88
31	3	1	1	1555	2590	1.67
32	3	1	1	1527	2820	1.85
33	3	2	1	1526	2830	1.85
34	3	2	1	1516	2780	1.83
35	3	1	1/4	372	740	1.99
36	3	1	1/4	372	740	1.99
37	3	1	1/4	370	740	2
38	3	2	1/4	377	740	1.96
39	3	2	1/4	374	730	1.95
40	3	1	1/2	766	1530	2
41	3	1	1/2	765	1440	1.88
42	3	1	1/2	738	1500	2.03
43	3	2	1/2	747	1510	2.02
44	3	2	1/2	752	1530	2.03
45	4	1	1	1377	130	0.09
46	4	1	1	1415	120	0.08
47	4	1	1	1401	130	0.09
48	4	2	1	1362	120	0.09
49	4	2	1	1362	120	0.09
50	4	1	1/4	347	40	0.12
51	4	1	1/4	340	30	0.09
52	4	1	1/4	354	30	0.08
53	4	2	1/4	348	40	0.11
54	4	2	1/4	344	90	0.26
55	4	1	1/2	713	70	0.1
56	4	1	1/2	690	60	0.09
57	4	1	1/2	687	60	0.09
58	4	2	1/2	689	60	0.09
59	4	2	1/2	703	60	0.09

TABLEAU E : Résultats des dosages de protéinurie et de créatinurie effectués par le laboratoire E

Numéro d'échantillon	Chien	Jour	Dilution	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU
1	1	1	1	719	390	0.54
2	1	1	1	642	360	0.57
3	1	1	1	729	390	0.54
4	1	2	1	737	390	0.53
5	1	2	1	764	360	0.47
6	1	1	1/4	206	90	0.44
7	1	1	1/4	181	80	0.43
8	1	1	1/4	175	70	0.19
9	1	2	1/4	176	40	0.21
10	1	2	1/4	208	80	0.37
11	1	1	1/2	355	180	0.51
12	1	1	1/2	365	160	0.44
13	1	1	1/2	387	170	0.45
14	1	2	1/2	341	190	0.55
15	1	2	1/2	350	160	0.47
16	2	1	1	1660	1250	0.78
17	2	1	1	1623	1200	0.74
18	2	1	1	1649	1310	0.73
19	2	2	1	1711	910	0.53
20	2	2	1	1613	1340	0.83
21	2	1	1/4	405	320	0.8
22	2	1	1/4	428	310	0.73
23	2	1	1/4	370	310	0.84
24	2	2	1/4	385	280	0.74
25	2	2	1/4	433	280	0.66
26	2	1	1/2	811	630	0.78
27	2	1	1/2	866	600	0.7
28	2	1	1/2	862	640	0.74
29	2	2	1/2	870	700	0.8
30	2	2	1/2	846	710	0.84
31	3	1	1	1397	2920	2.09
32	3	1	1	1426	2270	1.59
33	3	1	1	1458	2800	1.92
34	3	2	1	1442	2970	2.06
35	3	2	1	1446	2030	1.4
36	3	1	1/4	342	840	2.47
37	3	1	1/4	301	870	2.88
38	3	1	1/4	280	800	2.85
39	13	2	1/4	357	900	2.51
40	3	2	1/4	322	800	2.47
41	3	1	1/2	659	1630	2.55
42	3	1	1/2	644	1570	2.44
43	3	1	1/2	623	1550	2.49
44	3	2	1/2	642	1090	1.7
45	3	2	1/2	628	1150	1.82
46	4	1	1	1312	170	0.13
47	4	1	1	1322	160	0.12
48	4	1	1	1335	150	0.11
49	4	2	1	1338	160	0.12
50	4	2	1	1334	160	0.12
51	4	1	1/4	296	50	0.16
52	4	1	1/4	327	40	0.11
53	4	1	1/4	290	70	0.23
54	4	2	1/4	327	60	0.18
55	4	2	1/4	297	40	0.12
56	4	1	1/2	572	90	0.16
57	4	1	1/2	579	80	0.13
58	4	1	1/2	580	100	0.18
59	4	2	1/2	606	80	0.13
60	4	2	1/2	492	90	0.18

