



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 : 14456

To cite this version :

Ribleau, Pauline. *Électrophorèse des protéines urinaires à partir d'un spécimen conservé sur papier absorbant*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 72 p.

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

ELECTROPHORESE DES PROTEINES URINAIRES A PARTIR D'UN SPECIMEN CONSERVE SUR PAPIER ABSORBANT

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

RIBLEAU Pauline

Née, le 8 novembre 1988 à Aubergenville (78)

Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Catherine TRUMEL

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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

Directeur : **M. Alain MILON**

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. **SHELCHER 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**, *Zootéchnie*
- 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 CERTIFIÉS 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*

MAITRES DE CONFERENCE (Classe normale)

- 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 **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE 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*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

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

Remerciements

À notre président de jury,

Madame la Professeure Monique COURTADE-SAÏDI,
Professeure des Universités,
Praticien hospitalier,
Service d'Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

À notre jury de thèse,

Madame la Professeure Catherine Trumel,
Professeure à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Biologie Médicale Animale et Comparée,

Pour le choix du sujet et son encadrement au cours de la réalisation de ce travail,

Madame la Professeure Nathalie Bouges-Abella,
Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Histologie, Anatomie pathologique,

Qui nous a fait le plaisir d'accepter de participer à notre jury de thèse,

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION	13
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1. L'électrophorèse des protéines urinaires	15
1.1 L'objectif de la qualification d'une protéinurie rénale	15
1.2 Technique de l'électrophorèse	16
2. Les facteurs pré-analytiques et analytiques.....	17
2.1 Variations liées au type et à la préparation des urines	17
2.2 Stockage et délai du traitement des urines	18
3. Interprétation des profils électrophorétiques.....	19
3.1 Principe de l'interprétation.....	19
3.2 Intérêt diagnostique et pronostique	21
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	27
1. Matériel et méthodes	27
1.1 Déroulement de l'expérience.....	27
1.2 Animaux / spécimens	28
1.2.1 Critères d'inclusion	28
1.2.2 Critères d'exclusion	28
1.3 Collecte des spécimens urinaires.....	29
1.4 Étapes pré-analytiques.....	29
1.4.1 Préparation des urines sur papier absorbant.....	30
1.4.2 Conservation et traitements des urines	30
1.4.2.1 Spécimens liquides	30
1.4.2.2 Spécimens sur papier absorbant.....	30
1.5 Étapes analytiques.....	31
1.5.1 Etapes analytiques immédiates au jour de l'inclusion (J0).....	31
1.5.1.1 Analyse par bandelette urinaire et densité urinaire	31
1.5.1.2 Analyse du culot urinaire	31

1.5.1.3	Calcul initial du rapport Protéines urinaires/créatinine urinaire	32
1.5.1.4	Migration électrophorétique sur gel SDS-AGE	33
1.5.2	Analyses ultérieures	33
1.5.2.1	Resolubilisation des spécimens papiers	33
1.5.2.2	Réalisation des RPCU ultérieurs.....	34
1.5.2.3	Réalisation des SDS-AGE.....	34
1.6	Protocole expérimental.....	35
1.6.1	Essais préliminaires.....	35
1.6.1.1	Sur spécimens papier et eau distillée.....	35
1.6.1.2	Sur spécimens papier et urine.....	37
1.6.2	Comparaison des profils électrophorétiques obtenus à partir de spécimens liquides et spécimens papiers.....	37
1.6.3	Planning prévisionnel analytique par spécimen.....	38
2.	Résultats.....	39
2.1	Essais préliminaires	39
2.1.1	Essai préliminaire eau distillée sur papier absorbant.....	39
2.1.2	Essai préliminaire urine sur papier absorbant.....	40
2.2	Comparaison des profils électrophorétiques obtenus par spécimens liquides et spécimens papiers	41
2.2.1	Exclusion des gels électrophorétiques ininterprétables	41
2.2.2	Interprétation des profils électrophorétiques à J0	44
2.2.3	Variation d'intensité des profils électrophorétiques entre spécimen liquide et papier.....	46
2.2.4	Stabilité des profils électrophorétiques sur 5 jours de conservation sur papier absorbant.....	47
3.	Discussion	49
3.1	Synthèse critique sur les résultats de l'étude	49
3.2	Les défauts de l'étude	50
	CONCLUSION.....	51
	ANNEXES	55
1.	Annexe 1 : Fiche d'accompagnement de prélèvement	55
2.	Annexe 2 : Fiche d'analyse du prélèvement	57
3.	Annexe 3 : Guide d'utilisation du Liquidcheck Urine Chemistry Control, Bio- Rad _ Level 1, Bio RAD Laboratories, Marnes-la-Coquette, France	62
4.	Annexe 4 : Résultats RPCU et électrophorétiques des 19 chiens protéïnuriques.....	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Facteur préanalytique, d'après Giori et al., Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2011 ; 23(4) 682-690.	18
Figure 2. Exemples de profils électrophorétiques (gel SDS-AGE), d'après Giori et al., Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2011 ; 23(4) 682-690.	21
Figure 3. Essai Préliminaire sur Papier (EPP) : électrophorèses réalisées à partir d'eau distillée conservée sur papier absorbant.....	39
Figure 4. Résultat du spécimen Procon 4.....	40
Figure 5. Variation d'intensité des profils électrophorétiques entre l'urine d'un chien liquide ou stockée sur papier.	42
Figure 6. Profils électrophorétiques de quatre chiens protéinuriques à J0	45
Figure 7. Profil électrophorétique mixte sur spécimen liquide et papier (Procon 20)	46
Figure 8. Stabilité du profil électrophorétique du spécimen Procon 4.....	47
Figure 9. Variation d'intensité au cours du temps des profils sur spécimen papier...	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des éléments comptés lors de l'analyse du culot urinaire	32
Tableau 2. Tableau récapitulatif de l'essai préliminaire sur papier	36
Tableau 3. Planning prévisionnel analytique par spécimen	38
Tableau 4. Tableau récapitulatif des individus inclus dans l'étude	43
Tableau 5. Comparaison des classifications des échantillons d'urine liquides ou conservés sur papier	44

LISTE DES ABREVIATIONS

RPCU : rapport protéine sur créatinine urinaire

Prot : protéines

Créa : créatinine

INTRODUCTION

L'analyse quantitative et qualitative des protéines urinaires est un enjeu majeur, car elle permet la détection et la caractérisation des néphropathies tant chez l'homme que chez l'animal. La détermination de la nature des protéines urinaires par migration électrophorétique chez le chien aiderait ainsi à préciser la localisation de la lésion rénale. Deux techniques ont été validées chez le chien, la migration électrophorétique sur gel de polycramide (SDS-PAGE) et la migration électrophorétique sur gel d'agarose (SDS-AGE) ; la réalisation de SDS AGE étant actuellement la plus utilisée.

Les laboratoires de biologie médicale vétérinaire n'étant généralement pas à proximité des cliniques vétérinaires, les conditions pré-analytiques de réalisation d'une électrophorèse des protéines urinaires sont importantes à déterminer précisément pour une utilisation optimale par les vétérinaires praticiens. Une étude récente a mis en évidence une modification des profils électrophorétiques des protéines urinaires (SDS-AGE) lorsqu'ils étaient réalisés sur des urines conservées à -20°C, perturbant ainsi l'interprétation de cet examen (Théron, et al., 2013).

Dans l'hypothèse où le mode de conservation serait à l'origine d'une modification des profils électrophorétiques, pour faciliter le recueil et l'envoi des urines, une méthode alternative de conservation a été développée à partir d'urines conservées sur papier absorbant. Une étude préliminaire a démontré la faisabilité de cette méthode pour la mesure du RPCU sur papier absorbant (Nadaud, 2014).

Cette étude a donc pour objectifs 1/ d'évaluer la possibilité de réaliser des SDS-AGE des protéines urinaires à partir d'urines placées sur papier absorbant et 2/ d'évaluer la stabilité du profil électrophorétique lors de conservation à température ambiante des urines placées sur papier absorbant.

Après un rappel sur l'électrophorèse des protéines urinaires, le protocole expérimental et les résultats obtenus seront décrits dans une deuxième partie. Ils seront enfin discutés pour envisager leur possible exploitation pratique.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'électrophorèse des protéines urinaires

1.1 L'objectif de la qualification d'une protéinurie rénale

Lorsqu'une protéinurie est mise en évidence, à l'aide d'une bandelette ou d'un rapport protéines urinaires/ créatinine urinaire (RPCU), celle-ci peut être d'origine pré-rénale, rénale ou post rénale. Après avoir écarté respectivement les causes pré-rénales et post-rénales, une protéinurie rénale peut avoir elle-même plusieurs origines : elle peut effectivement être glomérulaire, tubulaire ou tubulo-interstitielle. Si la quantification des protéines par un RPCU permet de suspecter une origine glomérulaire lorsque le RPCU est supérieure à 2, elle ne peut donner d'indication sur l'origine lorsqu'elle est comprise entre 0,5 et 2 (Lees, et al., 2004). Les biopsies rénales sont le gold standard pour différencier des atteintes tubulaires, glomérulaires ou combinées mais la technique reste invasive et présente des risques pour l'animal, tels que le risque anesthésique, les risques d'infections ou d'hémorragies ultérieures. Ainsi, elle est peu réalisée en pratique courante.

La détermination de la nature des protéines urinaires permettrait aux praticiens d'avoir des informations sur l'origine d'une protéinurie rénale, et serait donc susceptible de jouer un rôle dans la détection précoce de lésions rénales et le suivi thérapeutique. (Schultze & Jensen, 1989). Physiologiquement l'urine ne contient que très peu de protéines. Ceci est expliqué par les mécanismes de filtration-réabsorption qui se jouent au niveau du rein. Les protéines dont la masse moléculaire est supérieure à celle de l'albumine ne passent pas le filtre glomérulaire. Les protéines ayant un poids moléculaire plus petit que celui de l'albumine (environ 69 kDa chez le chien) passent librement le filtre glomérulaire pour être réabsorbées ensuite au niveau de l'épithélium tubulaire du rein. L'albumine, quant à elle, est peu filtrée et est efficacement réabsorbée au niveau des tubules. Ainsi, les urines de chiens sains ne contiennent qu'une infime quantité d'albumine détectable.

Comme mentionné précédemment, une protéinurie peut avoir plusieurs origines : une filtration glomérulaire anormale, une réabsorption tubulaire déficiente ou les deux phénomènes coexistants. Une atteinte glomérulaire se traduit par une perte d'albumine et de protéines de haut poids moléculaire, une atteinte tubulaire, quant à elle, se traduit principalement par une perte de protéines de faible poids moléculaire. Lorsque les lésions du glomérule progressent, les protéines de haut poids moléculaire perturbent la réabsorption tubulaire, et la perte de protéines de faible poids moléculaires peut être décelée dans les urines.

On associe donc une protéinurie macromoléculaire (>69 kDa) à une lésion d'origine glomérulaire, une protéinurie micromoléculaire (<69 kDa) à une origine tubulaire. La perte concomitante de protéine micro et macromoléculaire est associée à des lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles.

La détermination de la nature des protéines urinaires par migration électrophorétique repose sur la différenciation des protéines selon leur poids moléculaire. Une technique sur gel polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et sur gel d'agarose contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-AGE) a été validées chez le chien (Schultze & Jensen, 1989; Zini, et al., 2004) mais en raison d'une plus faible capacité des gels de polyacrylamide à séparer les protéines de haut poids moléculaire et de leur possible effet toxique, les gels d'agarose sont les plus utilisés.

1.2 Technique de l'électrophorèse

Le principe de l'électrophorèse repose sur la séparation des protéines urinaires selon leur masse moléculaire après traitement dans un tampon neutre (pH=7,0) contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS). Les protéines, séparées sur un gel hautement réticulé, sont par la suite colorées par une solution violet acide.

Le SDS est un détergeant anionique qui se fixe aux protéines par liaisons hydrophobes (une molécule de SDS pour deux acides aminés). Les protéines perdent ainsi leur structure tridimensionnelle et les complexes SDS-protéines, ou micelles, formés ont tous la même charge négative et ont une taille proportionnelle à la protéine d'origine. Les gels hautement réticulés possèdent des pores calibrés qui freinent les micelles d'autant plus que les protéines sont de haut poids moléculaire.

Ainsi, les différences de migration entre les protéines traitées au SDS, dans un gel hautement réticulé, ne dépendent que de leur masse moléculaire. Afin de calibrer les masses moléculaires et de comparer les différentes migrations, un marqueur moléculaire, mélange de protéines de masse connues préparé dans les mêmes conditions, est soumis à la migration. Un gel contient plusieurs puits de migration dont un est systématiquement réservé à la migration du marqueur moléculaire. Il contient les protéines suivantes ; le lysozyme de masse moléculaire 15 kDa, la triose phosphate isomerase (27 kDa); l'albumine (69 kDa) et l'immunoglobuline G (150 kDa). La révélation des bandes de protéines se fait grâce à des colorants intenses, comme par exemple le violet acide, qui possèdent un seuil de détection de 15 mg de protéines / L d'urine.

2. Les facteurs pré-analytiques et analytiques

Il existe peu d'études en médecine vétérinaire quant à la stabilité des urines avant la réalisation d'électrophorèses. De plus, aucune donnée sur l'influence du mode de prélèvement des urines (cystocentèse, miction spontanée) n'a été répertoriée en médecine humaine ou vétérinaire.

2.1 Variations liées au type et à la préparation des urines

D'après l'European Urinalysis Guidelines et deux récentes études, il est conseillé de centrifuger les urines à faible vitesse (1000 à 1500g) afin d'éviter la présence de débris cellulaires et ainsi prévenir le développement de bactéries et une modification du profil protéique de l'urine. (Lee, et al., 2008; Thongboonkerk & Saetun, 2007)

Une récente étude (Ehrich & Wurster, 1991) préconise l'emploi d'urines n'ayant subi aucun traitement de concentration des protéines afin d'éviter une perte sélective ou non de protéines. A l'inverse, une forte concentration en protéines est un facteur de biais pour l'interprétation des profils électrophorétiques (figure 1). En effet, la méthode de colorimétrie est linéaire jusqu'à 2g de protéines par litre d'urine. Les urines dont la protéinurie est supérieure à 2000 mg/l doivent alors être diluées avec de l'eau distillée ou du NaCl 0,9%. (Zini, et al., 2004)

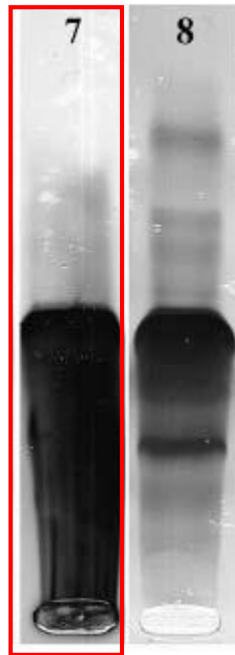


Figure 1. Facteur préanalytique, d'après Giori et al., *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011 ; 23(4) 682-690.

Le profil encadré en rouge représente un biais observé lorsque la concentration des protéines est supérieure à 2000 mg/ L, empêchant l'identification de bandes. Le profil à droite provient de la même urine diluée en proportion 1 :1 .

Pour chaque spécimen d'urine et avant la réalisation d'une électrophorèse, il est conseillé de mesurer sa densité urinaire car la proportion de profils « faux positifs » (apparition de bandes protéiques chez un animal sain) est significativement ($p= 0,0049$) plus fréquente avec des urines concentrées qu'avec des urines non concentrées. (Giori, et al., 2011)

2.2 Stockage et délai du traitement des urines

En médecine humaine, il semble que la conservation des urines à -70°C n'ait pas d'influence sur les profils électrophorétiques pendant une période égale ou supérieure à 12 mois. Par contre, lors de stockage des urines à -20°C pour une durée supérieure à 12 mois, on note des modifications des profils : des bandes de masse moléculaire plus faible que l'albumine apparaissent ainsi qu'une atténuation de la bande de l'albumine (Kania, et al., 2010). Sur une durée de stockage plus courte, une récente étude vétérinaire a mis en évidence une modification des profils électrophorétiques SDS-AGE des protéines urinaires conservées à -20°C ; une bande de poids moléculaire supérieure à celui de l'albumine apparaît à 15 jours

de conservation. En revanche, le tracé électrophorétique reste stable à température ambiante et à 4°C pendant 5 jours et à -80°C pendant 90 jours (Théron, et al., 2013).

Un délai d'attente de l'urine à température ambiante, de 0 à 24 h, avant stockage à -80°C n'a pas d'effet sur l'interprétation qualitative et quantitative de la protéinurie : le profil électrophorétique des protéines urinaires et la concentration en protéines à 0, 4, 8 et 24h est stable à température ambiante. (Lee, et al., 2008).

Cependant d'autres auteurs s'accordent à dire que l'urine ne doit pas être conservée plus de 8h à température ambiante et qu'il est préférable de la conserver à 4°C entre son prélèvement et la réalisation de l'électrophorèse. (Thongboonkerk & Saetun, 2007)

Enfin, il a été démontré que l'exposition de l'urine à des cycles de congélation à -80°C / décongélation à 37°C, réitérés jusqu'à 5 fois, n'avait pas d'influence sur le tracé des électrophorèses (Lee, et al., 2008).

3. Interprétation des profils électrophorétiques

3.1 Principe de l'interprétation

L'interprétation des profils électrophorétiques est principalement qualitative. Son principe repose sur la visualisation ou non de bandes de protéines correspondants à la migration de l'albumine, de protéines de plus faible masse moléculaire ou de plus haute masse moléculaire que l'albumine (environ 69 kDa). Les marqueurs moléculaires sont donc indispensables pour interpréter visuellement un profil électrophorétique puisqu'ils permettent de situer la zone de migration des protéines plus petites et plus grosses que l'albumine (Giori, et al., 2011; Giori, et al., 2011; Zini, et al., 2004).

On distingue ainsi différents profils :

- **Animal sain** : les chiens sains présentent un profil électrophorétique sans bandes apparentes ou avec une seule bande au niveau de la zone de migration de l'albumine. Cette bande est en général de faible intensité en raison de la faible quantité d'albumine retrouvée physiologiquement dans l'urine d'un chien (Zini, et al., 2004).
Lorsqu'on observe seulement une bande d'albumine chez un individu ayant un RPCU > 0,5, on parle de **profil albuminurique**.
Chez le chien mâle non castré, une bande de faible poids moléculaire peut être physiologiquement observée ; il s'agit d'une protéine prostatique, une arginine estérase de 25-30 kDa (Schellenberg, et al., 2008).
- **Atteinte glomérulaire** : on observe une bande plus ou moins intense au niveau de l'albumine et une ou plusieurs bandes en dessous (poids moléculaire > 69 kDa),
- **Atteinte tubulaire** : on visualise une ou plusieurs bandes au-dessus de la bande correspondant à la bande de migration de l'albumine (poids moléculaire <69 kDa),
- **Atteinte mixte** : on observe les bandes visualisées lors d'atteinte glomérulaire et tubulaire. (Figure 2)

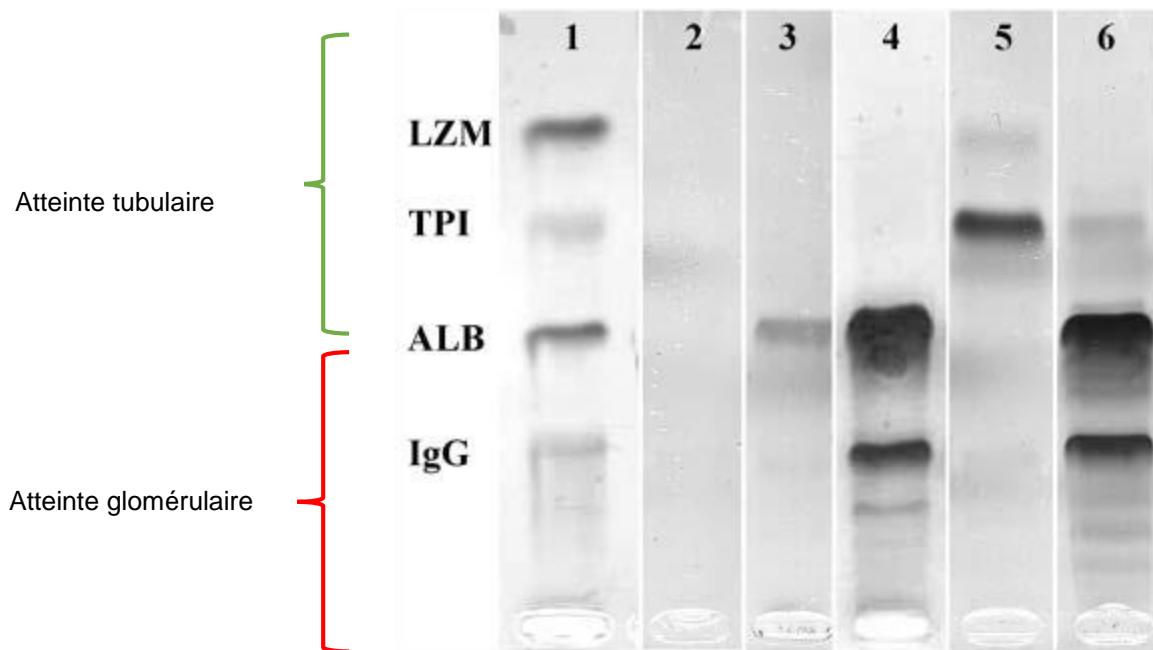


Figure 2. Exemples de profils électrophorétiques (gel SDS-AGE), d'après Giori et al., *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011 ; 23(4) 682-690.

La figure 2 représente les différents profils électrophorétiques que l'on peut obtenir. Le profil 1 correspond à la migration du marqueur moléculaire (LZM = lysozyme (15kDa), TPI= triose phosphatase isomérase (27 kDa), ALB= albumine (66 kDa) , IgG= immunoglobuline G (150kDa)). Le profil 2 est un témoin négatif. Le profil 3 ne présente qu'une seule bande albumine, il présente un profil albuminurique. Le profil 4 représente une atteinte glomérulaire, le profil 5 une atteinte tubulaire et le 6 une atteinte mixte.

3.2 Intérêt diagnostique et pronostique

Une étude (Schultze & Jensen, 1989) a montré l'intérêt des électrophorèses SDS-PAGE dans la détermination de l'origine d'une protéinurie, en comparant les résultats obtenus entre des électrophorèses et des biopsies rénales. L'étude a été menée sur 12 chiens protéinuriques (âge moyen = 7,5 ans) dont la protéinurie était supérieure 0,3 g/L et dont le culot urinaire ne présentait aucune anomalie. Un groupe de chiens contrôle (n = 6, âge moyen = 4,6 ans) a été sélectionné sur la base d'un examen clinique et une analyse urinaire sans anomalie.

Sur les 12 chiens protéinuriques, 4 chiens présentaient un profil glomérulaire, 2 chiens avaient un profil tubulaire et 6 chiens un profil mixte. Les biopsies rénales ont été réalisées sur tous

les chiens à profil mixte, et sur 2 chiens à profil glomérulaire. Les résultats des biopsies et des électrophorèses ont été interprétées séparément et sans connaître l'historique de l'animal. Il a été observé que les 2 chiens à profil glomérulaire ont eu un résultat de biopsies en faveur d'une atteinte glomérulaire (glomérulonéphrite). Pour les 6 chiens à profil mixte, les biopsies rénales ont donné des résultats en faveur d'une atteinte mixte dans 5 cas sur 6. L'étude n'a montré qu'un seul cas pour lequel une inadéquation des résultats a été observée (profil électrophorétique mixte, biopsie en faveur d'une atteinte glomérulaire) et qui, selon les auteurs, peut s'expliquer par une biopsie rénale trop petite pour réaliser un diagnostic précis. Les 6 chiens sains sélectionnés ont présenté un profil électrophorétique avec 3 fines bandes situées entre l'albumine (69 kDa) et la transferrine (100 kDa) mais aucune biopsie rénale n'a été réalisée sur le groupe de chiens sains ; ainsi il n'a pas été vérifié histologiquement la présence ou non de lésions rénales.

L'étude a donc mis en évidence une bonne corrélation entre les résultats obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et ceux obtenus par biopsie rénale. Toutefois cette étude n'a été réalisée que sur un faible nombre de chiens protéinuriques (n= 12) et les biopsies n'ont été réalisées que pour 8 d'entre eux.

Une étude plus récente (Brown, et al., 2010), menée sur 70 chiens atteints d'affections rénales, comparant les résultats d'électrophorèses SDS-PAGE avec ceux obtenus par biopsie rénale, a montré une bonne sensibilité des électrophorèses SDS-PAGE pour prédire la présence de lésions glomérulaires et tubulaires (respectivement 97% et 82%) mais une spécificité modérée avec respectivement 60% et 50% : certains animaux sains (sans lésions rénales histologiques) présentent donc des profils électrophorétiques anormaux. Lorsque les électrophorèses étaient interprétées en parallèle d'un RPCU, leur spécificité était augmentée. L'électrophorèse des protéines urinaires apparaît donc comme un bon outil de détection des atteintes rénales (glomérulaires et tubulaires) mais doit être interprétée en adjonction d'autres tests biochimiques (RPCU par exemple).

Une étude récente (Zini, et al., 2004) a montré l'intérêt de l'électrophorèse SDS-PAGE en procédant, comme dans les études préalablement citées, à une comparaison entre des résultats histologiques et des résultats de profil électrophorétique. L'étude a été menée sur 49 chiens protéinuriques (âge moyen = 6 ans, 20 femelles et 20 mâles) dont le RPCU était supérieur à 0,5 et la concentration en créatinine supérieure à 1,5 mg/dL. Parmi les 49 chiens, 32 étaient atteints de maladies vectorielles (leishmaniose, babésiose, erlichiose). La valeur moyenne des RPCU obtenus étaient de 2,9 [0,3-18,5]. Les résultats histopathologiques ont révélé 36 atteintes mixtes, 5 atteintes tubulaires et 8 atteintes glomérulaires. Après comparaison des résultats des électrophorèses et ceux des biopsies rénales, la technique

SDS-AGE a été validée chez le chien, avec une sensibilité de 100% pour la détection des lésions glomérulaires et de 92,7% pour les lésions tubulaires. La spécificité reste également modérée avec respectivement 40% et 62,5% pour les lésions glomérulaires et tubulaires. Cependant, la spécificité a été difficile à interpréter en raison du faible nombre d'atteintes glomérulaires (n = 8) ou tubulaires (n=5) isolées. L'évaluation qualitative des protéines tubulaires est légèrement moins sensible que l'évaluation des protéines glomérulaires (100%). 41 chiens de l'étude présentaient au moins une atteinte tubulaire : 28 chiens présentaient une atteinte tubulaire légère ou très localisée, et 13 chiens présentaient une atteinte tubulaire marquée et/ou diffuse. Parmi les 28 chiens à atteinte légère à modérée, 3 ont eu un profil électrophorétique sans bandes tubulaires (faux-négatif), ce qui expliquerait une sensibilité plus faible. Ainsi, l'électrophorèse SDS-AGE permet de détecter des lésions tubulaires avancées, mais pas des atteintes légères ou modérées.

D'après cette même étude, les électrophorèses de protéines urinaires pourraient aussi avoir un intérêt pronostic en donnant une indication sur le stade, plus ou moins avancé, lors d'une atteinte tubulaire. Sur les 13 chiens atteints de lésions tubulaires sévères, tous présentaient les bandes protéiques à 12 kDa et 15 kDa alors que ces bandes ne sont jamais observées chez les 28 chiens à atteinte plus légères (sensibilité et spécificité de 100%). De même, une bande protéique à 21 kDa a été détectée chez tous les chiens à lésions tubulaires sévères et seulement chez quelques chiens à lésions tubulaires légères à modérées (7/28). Ainsi, il apparaît que les lésions les plus sévères sont caractérisées par un profil électrophorétique à protéines de très faible poids moléculaire.

Enfin, une bande protéique à 25 kDa, est plus souvent observée chez des chiens présentant des atteintes tubulaires sévères (13/13) et légères à modérées (15/28) que chez des individus à compartiment tubulo-interstitiel normal (3/8). Dans une étude précédente (Bonfanti, et al., 2004), 11 chiens exposés à la leishmaniose, babésiose ou l'erlichiose, avec des biopsies rénales ne révélant aucune anomalie, présentaient une protéinurie avec une bande isolée entre 22 et 27 kDa, correspondant à des chaînes légères d'immunoglobuline.

Dans l'étude de Zini, parmi les 49 chiens, 32 chiens avaient au moins l'une de ces 3 maladies vectorielles, les auteurs ont ainsi supposé que la bande protéique à 25 kDa pourrait être une chaîne légère d'immunoglobulines. La bande de 25 kDa serait donc intéressante en terme de diagnostic, en révélant la présence de chaîne légère d'immunoglobuline et de pronostic car elle est retrouvée plus particulièrement lors d'atteintes tubulaires les plus sévères. Ainsi, l'électrophorèse SDS-AGE apparaît particulièrement utile pour identifier les chiens avec les lésions tubulo-interstitielles sévères, tandis que les atteintes plus légères peuvent ne pas être détectées.

Pour une protéinurie glomérulaire, on distingue une protéinurie sélective d'une protéinurie non sélective. Dans une protéinurie sélective, seules quelques protéines passent la barrière glomérulaire alors que dans une protéinurie dite non sélective, l'ensemble des protéines du plasma peuvent passer le filtre. Le degré de sélectivité du glomérule peut donner une indication sur la gravité de ses lésions ; lors d'une protéinurie sélective les lésions glomérulaires observées sont modérées alors que pour une protéinurie non sélective les lésions sont plus sévères (Bernard, 2001).

L'évaluation qualitative des protéines urinaires semble donc être un bon outil diagnostique mais il est préconisé de l'utiliser en adjonction d'une analyse quantitative de la protéinurie. Dans une récente étude, des électrophorèses SDS-AGE ont été réalisées sur 32 chiens non protéinuriques (RPCU < 0,2), 15 chiens à RPCU douteux ($0,2 < \text{RPCU} < 0,5$) et 40 chiens protéinuriques (RPCU > 0,5). Parmi les 32 chiens non protéinuriques, 14 individus ont présenté un tracé électrophorétique glomérulaire (n=7), tubulaire (n=3) ou mixte (n=4). En prenant un RPCU supérieur à 0,2 comme valeur seuil de protéinurie, la valeur prédictive positive de la méthode SDS-AGE est inférieure à 80% : ainsi 20% de chiens non protéinuriques (RPCU < 0,2) peuvent être diagnostiqués comme atteints d'une protéinurie glomérulaire, tubulaire ou mixte lorsque l'électrophorèse a été réalisée sans avoir le résultat du RPCU (Giori, et al., 2011).

L'évaluation qualitative des protéines urinaires par électrophorèse est donc une méthode intéressante pour déterminer l'origine d'une protéinurie, à savoir glomérulaire, tubulaire ou mixte, lorsque celle-ci est associée à une interprétation quantitative de la protéinurie. En raison de conditions de préparation et de stockage des urines plutôt contraignantes, cet examen est peu réalisé en pratique courante. Ainsi, une méthode de conservation des urines sur papier absorbant pourrait s'avérer utile pour les praticiens vétérinaires leur facilitant ainsi la préparation, la conservation et l'envoi des spécimens d'urine. Dans notre étude, nous étudierons l'influence de ce mode de conservation sur les profils électrophorétiques sur un délai 5 jours, délai considéré comme maximum, pour un envoi par la poste entre une clinique vétérinaire et un laboratoire d'analyses.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Matériel et méthodes

1.1 Déroulement de l'expérience

Cette étude prospective a été menée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) entre Octobre 2014 et Avril 2015 avec pour objectif de comparer les résultats des profils électrophorétiques des protéines urinaires à partir de spécimens recueillis sur papier absorbant à ceux obtenus avec le surnageant urinaire liquide.

Pour chaque spécimen étudié, un profil électrophorétique des protéines urinaires a été réalisé :

1/ À partir du prélèvement liquide, récolté par cystocentèse ou miction spontanée, et conservé après centrifugation à température ambiante.

2/ À partir du même prélèvement d'urine conservé sur du papier absorbant, stocké à température ambiante.

L'étude s'est déroulée en 3 phases :

1/ deux essais préliminaires qui ont eu pour but de vérifier la faisabilité d'un profil électrophorétique des protéines urinaires avec des urines conservées sur papier absorbant.

2/ une étude de comparaison des profils électrophorétiques obtenus sur un prélèvement liquide conservé à température ambiante et sur papier absorbant, au sein d'une population de chiens protéinuriques.

3/ Une étude de la stabilité sur 5 jours.

1.2 Animaux / spécimens

1.2.1 Critères d'inclusion

L'étude a été menée sur des chiens reçus à la clinique des animaux de compagnie de l'ENVT de Décembre 2014 à Avril 2015, après complète information du propriétaire et la signature du « Formulaire de consentement éclairé ». Tout chien présenté pour une consultation ou une hospitalisation à l'ENVT et nécessitant, pour raison médicale, la réalisation d'une analyse d'urine complète et l'évaluation du rapport protéines urinaires sur créatinine urinaire (RPCU) pouvaient être inclus dans l'étude, si le volume d'urine était suffisant (6 mL au minimum).

Les chiens ont été inclus indépendamment de leur race, de leur âge, et de leur sexe. Chaque animal inclus dans l'étude possède :

- une fiche d'accompagnement de prélèvement sur laquelle sont rapportés le nom du propriétaire, le nom de l'animal, son numéro d'identification ENVT et son numéro d'identification pour l'étude (Annexe n°1).
- une fiche d'analyse sur laquelle n'est mentionné que son numéro d'étude (Annexe n°2).

Les chiens ont été identifiés de la façon suivante : «PROCON 1 à X » selon l'ordre chronologique de leur inclusion dans l'étude, « PROCON » signifiant PROtéinurie CONservation.

Les animaux prélevés ayant été exclu de l'étude ont conservé leur identification afin d'être répertoriés.

1.2.2 Critères d'exclusion

Aucun critère d'exclusion n'a été fixé pour le recrutement des animaux. Tout chien nécessitant une analyse urinaire complète, sur recommandation du vétérinaire consultant a pu être intégré dans l'étude. L'exclusion d'un individu dépendait des résultats des analyses urinaires faites au Laboratoire Central de l'ENVT et les critères d'exclusion sont les suivants :

- Un examen cytologique du culot urinaire révélant un sédiment inflammatoire ou une bactériurie.
- Un RPCU dont la valeur est inférieure à 0,5.
- Une protéinurie quantitative inférieure à 500 mg/L (le jour d'inclusion).

1.3 Collecte des spécimens urinaires

Les urines ont été recueillies indifféremment par cystocentèse échoguidée ou par miction spontanée, sachant que le RPCU varie très faiblement selon le mode de prélèvement en cas d'absence de sédiment (Beatrice , et al., 2010). Pour chaque spécimen, un volume minimal total de 6 ml a été collecté.

Après récupération des urines, celles-ci ont été placées dans un tube sec en plastique propre non stérile (tube à hémolyse bouché en polystyrène et fond rond, 75 x 13mm, 4 mL, Gosselin, Borre, France) préalablement identifiés du numéro d'étude (PROCON 1 à PROCON X).

Dans un délai maximal de deux heures (Clinical and Laboratory Standards Intitute, 2001), les spécimens ont été amenés au Laboratoire central de l'ENVT accompagnés du consentement éclairé et des fiches de prélèvement et d'analyse.

1.4 Étapes pré-analytiques

Après l'analyse des urines par bandelettes urinaires (cf 6.2), les tubes à fond rond remplis d'urine ont été centrifugés dans la centrifugeuse ROTOFIX 32A (Andreas Hettich GmbH and Co. KG D- 78532 Tuttlingen) à 1500 tours/min (RCF=250g) pendant 5 minutes selon les recommandations du (Clinical and Laboratory Standards Intitute, 2001). Le surnageant a été utilisé pour la réalisation des spécimens papiers ainsi que pour préparer les spécimens liquides.

L'extraction du surnageant a été faite à l'aide de pipette à usage unique (Pipette pasteur plastique pointe fine, Copan, Brescia, Italia).

1.4.1 Préparation des urines sur papier absorbant

Des carrés de papier absorbant à usage domestique (papier essuie-tout type Sopalin®, rouleaux neufs, visuellement propres) d'environ 4.5 x 4.5 cm ont été utilisés. Ils ont été chacun déposés sur une plaque de verre pour recevoir 200 µL de surnageant. Pour chaque prélèvement d'urine, 4 carrés de papier absorbant ont été préparés et séchés à température ambiante à l'abri des courants d'air pendant environ 2 heures en moyenne puis chaque spécimen papier est conservé dans une enveloppe en papier identifiée « PROCON P1 à PROCON PX».

1.4.2 Conservation et traitements des urines

1.4.2.1 *Spécimens liquides*

Le surnageant a été réparti dans 4 tubes Eppendorf® préalablement identifiés « PROCON 1 à X». Ces 4 tubes ont été conservés à température ambiante, la mention J0, J1, J2, J5 est ajoutée ainsi que la mention « TA » pour « Température Ambiante ». Ex : « PROCON 1 à X, J0 TA » ; « PROCON 1 à X, J1 TA », etc.

1.4.2.2 *Spécimens sur papier absorbant*

Les spécimens papiers ont été individuellement placés dans une enveloppe préalablement identifiée. Les enveloppes ont été ensuite glissées dans une feuille plastique identifiée « PROCON P1 à PROCON PX», elle-même rangée dans un classeur identifié « ETUDE PROCON Papier » et conservé à température ambiante et stable (température climatisée et contrôlée du Laboratoire central).

1.5 Étapes analytiques

1.5.1 Etapes analytiques immédiates au jour de l'inclusion (J0)

1.5.1.1 *Analyse par bandelette urinaire et densité urinaire*

Une analyse chimique de l'urine native a été réalisée pour chaque animal, au moyen d'une bandelette urinaire (Urine Reagent Strip for urinalysis URS-10, Teco Diagnostics, Anaheim CA, USA) dont les résultats ont été reportés sur la fiche analytique de chaque individu. L'analyse par bandelette a été réalisée par dépôt d'urine au compte-gouttes et non par trempage dans le but d'économiser le volume initial recueilli du spécimen.

Une mesure de la densité urinaire a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre optique Atago T2-NE (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japon), à température ambiante (environ 20°C). Avant chaque série de mesures, l'étalonnage du réfractomètre a été effectuée avec de l'eau distillée de densité égale à 1,000 et corrigée si nécessaire avec la vis située à l'avant de l'oculaire. Une goutte d'urine était déposée sur le prisme du réfractomètre et la densité était relevée sur la plage de lecture correspondante pour être consignée sur la fiche analytique de chaque individu.

1.5.1.2 *Analyse du culot urinaire*

Pour chaque individu, une goutte du sédiment remis en suspension a été déposée sur une lame en verre (Thermo Scientific Menzel-Gläser) et recouverte d'une lamelle (Menzel-Gläser). L'examen cytologique a été réalisé au moyen d'un microscope Nikon Eclipse E200 avec les objectifs à x10, x20, x40. L'intensité lumineuse, la fermeture du diaphragme et la descente du condensateur ont été réglés de façon à observer nettement les différents éléments du prélèvement.

Une première analyse a été réalisée au grossissement x10 sur toute la lamelle afin d'apprécier la richesse du prélèvement, la présence éventuelle de cristaux et de cylindres et de faire le tri entre les éléments d'intérêts (cellules, cylindres, cristaux) et les artéfacts de préparation (bris de verre, bulles, fibres...).

Ensuite, une analyse à plus fort grossissement x40 a été réalisée en sélectionnant dix champs bien distincts. Sur chaque champ, les éléments d'intérêts ont été comptés et

consignés dans la colonne correspondante du tableau (Tableau 1). La moyenne des 10 champs constituait la donnée brute exploitée par la suite. En effet, un examen cytologique révélant un sédiment inflammatoire (plus de 5 globules blancs par champ) ou la présence d'une bactériurie était un facteur d'exclusion.

Tableau 1. Liste des éléments comptés lors de l'analyse du culot urinaire

	Cham p 1	Cham p 2	Cham p 3	Cham p 4	Cham p 5	Cham p 6	Cham p 7	Cham p 8	Cham p 9	Cham p 10
Cristaux (x400)										
Hématies (x400)										
Leucocytes (x 400)										
Cylindres (x400)										
Bactéries										
Spermatoz- oïdes										
Cellules épithéliales										

1.5.1.3 Calcul initial du rapport Protéines urinaires/créatinine urinaire

Le ratio protéines urinaires / créatinine urinaire (RPCU) a été calculé à partir des concentrations de la créatinine urinaire et des protéines urinaires du surnageant urinaire. Pour chaque spécimen liquide, il a été mesuré deux fois (excepté pour Procon 2). La méthode utilise un analyseur de transfert (K.Bio 2, Kitvia, Labarthe Inard, France) et des réactifs spécifiques (Protein u&csf et Créatinine monoreactif liquide stable PAE, Kitvia, Labarthe Inard, France).

Le dosage de la créatinine urinaire repose sur la réaction de Jaffé et le dosage des protéines urinaires utilise une méthode colorimétrique au rouge pyrogallol. Les valeurs des protéines et créatinine urinaires ont été reportées sur la feuille d'analyse de chaque animal ainsi que le RPCU calculé.

Avant chaque série de mesures, l'analyseur a été au préalable contrôlé pour les deux analytes selon le protocole fourni par le fabricant avec une urine de contrôle humaine (Annexe 3).

À chaque changement de lot de réactif, une calibration a été effectuée avec un calibrant (Liquidcheck Urine Chemistry Control Bio-Rad _ Level 2, Bio RAD Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) avec une dilution à 1 : 10 pour la mesure de la créatinine urinaire.

1.5.1.4 Migration électrophorétique sur gel SDS-AGE

Les urines dont la concentration en protéines du surnageant était supérieure à 1500 mg/L ont été diluées au 1 :1 avec du NaCl 0,9%. Celles dont la concentration était supérieure à 3000 mg/l ont été diluées au 1 :2.

80 µl de la dilution ou du surnageant initial (si la concentration en protéines est inférieure à 1500mg/l) a été mélangé avec 20 µl de diluant inclus dans le kit du fabricant et contenant du SDS et du bleu de bromophénol (Hydragel 5 proteinuria, Sebia Italia SRL, Bagno a Ripoli, Firenze Italy). Ce mélange a été agité au vortex pendant 30 secondes.

L'analyseur électrophorétique correspondant (Hydrasys 2, Sebia Italia SRL, Bagno a Ripoli, Firenze Italy) a été préparé selon les recommandations du fabricant en plaçant les éponges déjà imbibées de la solution tampon adéquate (pH = 8.5) et en présélectionnant le mode de migration adéquat.

5 µL du mélange décrit précédemment a été placés dans un des 5 puits de migration de la feuille de gel, le dernier étant réservé au marqueur moléculaire nécessaire à l'interprétation des profils électrophorétiques.

Chaque gel a été positionné après l'ajout de 120 µL d'eau distillée au centre du plateau de migration sérigraphié pour un gel ou 100 µL dans chaque cadre sérigraphié pour deux gels.

À la fin de la migration, chaque gel a été récupéré pour être placé dans le porte film du bac à coloration, en respectant les consignes fournies par le fabricant.

1.5.2 Analyses ultérieures

1.5.2.1 Resolubilisation des spécimens papiers

Chaque spécimen papier a été resolubilisé afin de récupérer un surnageant utilisé pour la réalisation des RPCU et des migrations électrophorétiques. Pour cela, chaque carré de papier absorbant a été retiré de son enveloppe, découpé en petits morceaux avec des ciseaux réservés à cet usage, puis a été placé dans un tube Eppendorf®. L'identification de l'enveloppe et le jour de l'analyse ainsi que la mention « P » pour « Papier » ont été préalablement reportés sur le tube Eppendorf® : PROCON X JY P.

Un volume de 0,5 mL d'eau distillée a été ajouté puis le tube a été agité au Vortex (Heidolph Top Mix 94323, Bioblochscientific) pendant 30 secondes puis laissé à température ambiante pendant environ 10 minutes. Pour finir le tube a été centrifugé pendant 5 minutes à environ 4000g. Le surnageant a été récupéré pour réaliser un RPCU puis une SDS-AGE, avec les mêmes protocoles décrits en 1.5.1.3 et 1.5.1.4.

1.5.2.2 *Réalisation des RPCU ultérieurs*

Les RPCU sur papier ont été mesurés comme décrit précédemment, sur le surnageant des spécimens papiers resolubilisés. Il a été montré que les RPCU étaient stables pour des urines conservées sur papier absorbant pendant 5 jours (Nadaud, 2014).

1.5.2.3 *Réalisation des SDS-AGE*

Les SDS-AGE ont été réalisées comme décrit précédemment sur le surnageant des spécimens liquides à température ambiante et des spécimens papiers aux dates mentionnées ci-dessous. Les dilutions ont été réalisées en fonction des valeurs de protéines du surnageant préalablement mesurées. Les SDS-AGE ont été disposés dans le même ordre pour chaque animal depuis la gauche vers la droite : spécimen conservé à température ambiante et sur papier absorbant. Pour chaque prélèvement urinaire, une SDS-AGE sur les spécimens liquides témoins est réalisée et sera placée à l'extrémité droite de la feuille de gel.

- A J0 + 1 jours, pour les spécimens liquides conservés à température ambiante respectivement identifiés « PROCON 1 à X, J1 TA » et pour les spécimens sur papier identifiés « PROCON P1 à PX, J1 »,
- A J0 + 2 jours, pour les spécimens liquides conservés à température ambiante respectivement identifiés « PROCON X J2 TA », pour les spécimens sur papier identifiés « PROCON X J2 P »,
- A J0 + 5 jours pour les spécimens liquides conservés à température ambiante respectivement identifiés « PROCON 1 à X, J5 TA » et pour les spécimens sur papier identifiés « PROCON P1 à PX, J5 ».

1.6 Protocole expérimental

1.6.1 Essais préliminaires

Ces études préliminaires ont eu pour objectifs d'évaluer la faisabilité de la réalisation d'électrophorèse sur gel SDS-AGE sur des urines conservées sur du papier absorbant à usage domestique.

1.6.1.1 *Sur spécimens papier et eau distillée*

Cet essai préliminaire a été réalisé dans le but de vérifier l'absence de bandes de migration lorsque l'on réalise une électrophorèse avec de l'eau distillée conservée sur papier absorbant.

Quatre séries de 4 carrés de papier absorbant à usage domestique (papier essuie-tout type Sopalin®, rouleaux neufs, visuellement propres) d'environ 4,5 x 4,5 cm ont été préparés. Les deux premières séries de 4 carrés provenaient d'un même rouleau de papier absorbant, préparées à partir de deux feuilles différentes prises au hasard dans le rouleau. Les deux autres séries de 4 carrés provenaient de deux feuilles différentes choisies de façon similaire au sein d'un deuxième rouleau de même marque de papier absorbant.

Ils ont chacun été déposés sur une plaque de verre pour recevoir 200 µl d'eau distillée. Les papiers absorbants ont été séchés à température ambiante à l'abri des courants d'air pendant 2 heures. Les 4 spécimens papiers d'une même série ont été conservés dans une enveloppe en papier identifiée « EP PROCON P1 à P4 ».

A chaque jour d'analyse définit par le planning prévisionnel (ci-dessous) un carré de papier absorbant a été retiré de chaque enveloppe P1 à P4 puis a été découpé en petits morceaux avec des ciseaux réservés à cet usage. Les morceaux ont été introduits dans un tube Eppendorf (tube 1.5mL, Safe-Lock Eppendorf®, Le Pecq, France). Sur chaque tube a été reporté, l'identification du spécimen papier « EP PROCON P1 à P4 » ainsi que le jour de l'analyse (J0, J1, J2 ou J5). Dans chaque tube Eppendorf, un volume de 0,5 ml d'eau distillée a été ajouté. Le tube a été ensuite agité au Vortex pendant 30 secondes puis laissé à température ambiante pendant environ 10 minutes.

Pour finir le tube a été centrifugé pendant 5 minutes à environ 4000 g puis récupéré pour réaliser une électrophorèse sur gel SDS-AGE.

Tableau 2. Tableau récapitulatif de l'essai préliminaire sur papier

Phase de l'étude	Date des analyses Heure des analyses	SDS-AGE Spécimens utilisés	Remarques
J0/..... .../.....h	Papier EP PROCON P1 J0 Papier EP PROCON P2 J0 Papier EP PROCON P3 J0 Papier EP PROCON P4 J0	P1 et P2 : 1er rouleau, feuilles séparées P3 et P4 : 2 ^{ème} rouleau, feuilles séparées
J0+1/..... .../.....h	Papier EP PROCON P1 J1 Papier EP PROCON P2 J1 Papier EP PROCON P3 J1 Papier EP PROCON P4 J1	1 papier prélevé dans chacune des enveloppe EP PROCON P1, P2, P3 et P4
J0+2/..... .../.....h	Papier EP PROCON P1 J2 Papier EP PROCON P2 J2 Papier EP PROCON P3 J2 Papier EP PROCON P4 J2	1 papier prélevé dans chacune des enveloppe EP PROCON P1, P2, P3 et P4
J0+5/..... .../.....h	Papier EP PROCON P1 J5 Papier EP PROCON P2 J5 Papier EP PROCON P3 J5 Papier EP PROCON P4 J5	1 papier prélevé dans chacune des enveloppe EP PROCON P1, P2, P3 et P4

1.6.1.2 *Sur spécimens papier et urine*

Cet essai préliminaire a été réalisé sur 4 chiens protéinuriques inclus dans l'étude après la réalisation de l'analyse complète de l'urine (bandelette, culot urinaire, RPCU). Le but était de vérifier la visualisation d'un profil électrophorétique pour des urines conservées sur papier absorbant.

Après resolubilisation de chaque morceau de papier et récupération du surnageant, les électrophorèses sur gel SDS-AGE ont été réalisées en suivant le planning prévisionnel (cf 1.6.3).

1.6.2 Comparaison des profils électrophorétiques obtenus à partir de spécimens liquides et spécimens papiers

Cette étude a porté sur 19 spécimens dont le RPCU était supérieur à 0,5 et la protéinurie supérieure à 500 mg/L. Tous les résultats des électrophorèses SDS-AGE obtenus avec les urines conservées sur papier absorbant ont été comparés visuellement à ceux obtenus avec les spécimens liquides à J0, J1, J2, J5.

1.6.3 Planning prévisionnel analytique par spécimen

Tableau 3. *Planning prévisionnel analytique par spécimen*

Phase de l'étude	Date des analyses Heure des analyses	RPCU Spécimens utilisés	SDS-AGE Spécimens utilisés	Remarques
J0/...../.....h	Liquide PROCON X J0 TA Papier PROCON X J0 P	Liquide PROCON X J0 TA Papier PROCON PX J0	DU BU ECCU
J0+1/...../.....h		Liquide PROCON X J1 TA Papier PROCON PX J1	
J0+2/...../.....h		Liquide PROCON X J2 TA Papier PROCON PX J2	
J0+5/...../.....h		Liquide PROCON X J5 TA Papier PROCON PX J5	

2. Résultats

2.1 Essais préliminaires

2.1.1 Essai préliminaire eau distillée sur papier absorbant

L'objectif de cet essai préliminaire était de vérifier l'absence de profil électrophorétique lors de la réalisation d'électrophorèses SDS-AGE avec de l'eau distillée stockée sur papier absorbant.

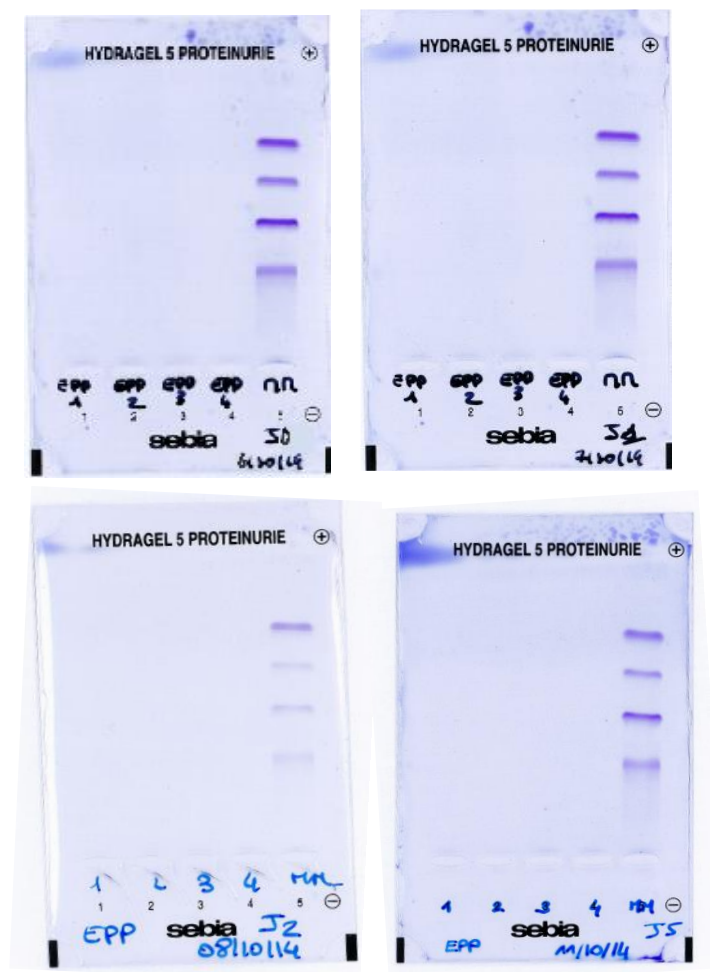


Figure 3. Essai Préliminaire sur Papier (EPP) : électrophorèses réalisées à partir d'eau distillée conservée sur papier absorbant.

De gauche à droite et de haut en bas : tracé électrophorétique de l'eau distillée conservée sur papier absorbant depuis 2h (J0), depuis 24h (J1), depuis 48h (J2) et depuis 5 jours (J5). Chaque série (numérotée de 1 à 4) comprenait quatre morceaux de papiers (respectivement pour J0, J1, J2, J5) ayant chacun reçu 200 μ L d'eau distillée.

À J0, J1, J2 et J5, les tracés électrophorétiques ne présentent aucune bande de migration pour les différentes séries de papier et eau distillée.

2.1.2 Essai préliminaire urine sur papier absorbant

Cet essai préliminaire a été réalisé sur 4 chiennes protéinuriques (4 femelles dont 3 stérilisées et 1 femelle entière). Les résultats des bandelettes urinaires affichaient au moins 2+ sur la plage des protéines avec des urines isosténuriques (densité urinaire comprise entre 1,014 et 1,026). Sur ce lot, le RPCU moyen mesuré sur urine liquide était de 1,9 [1,8 ; 2] et la protéinurie moyenne était de 2097 [1083 ; 2999] mg/L. Le RPCU moyen mesuré sur papier absorbant réhydraté était de 1,8 [1,5 ; 3,6] et la protéinurie moyenne de 1046 mg/L. Les résultats des quatres premiers spécimens inclus, nommés respectivement Procon 2, Procon 4, Procon 5 et Procon 6, sont reportés dans la feuille d'annexe n°4.

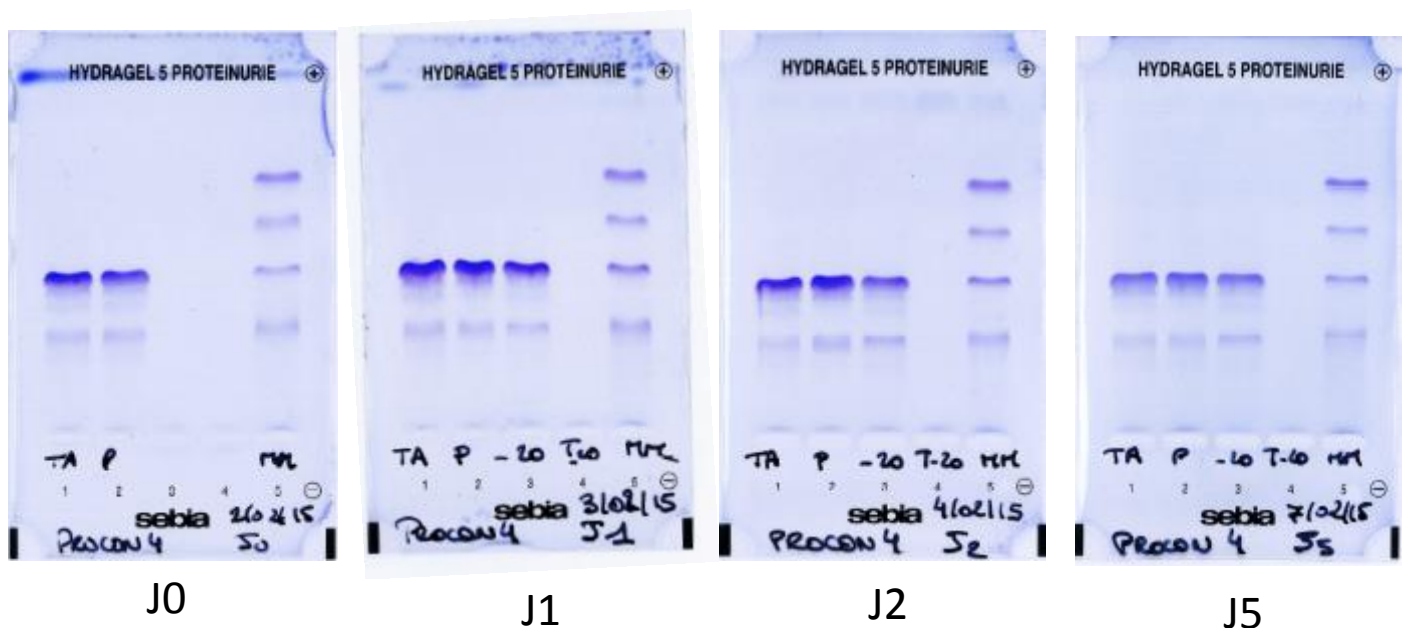


Figure 4. Résultat du spécimen Procon 4.

De gauche à droite : tracés électrophorétiques de J0 à J5 obtenus pour les urines liquides conservées à température ambiante (TA) et sur papier absorbant (P). Le profil MM désigne le tracé électrophorétique du marqueur moléculaire

Pour les 4 chiens protéinuriques, on obtient un tracé électrophorétique discernable, c'est-à-dire avec des bandes électrophorétiques distinctes les unes des autres et permettant une comparaison avec les marqueurs moléculaires et la migration de l'urine liquide conservées à température ambiante (Figure 4).

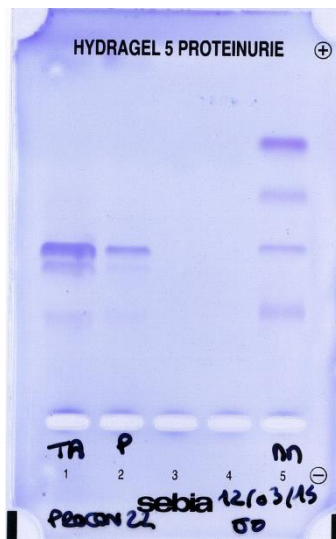
D'après les résultats obtenus lors de cet essai préliminaire, il est donc possible de réaliser une électrophorèse sur gel SDS-AGE à partir d'urines conservées sur papier absorbant. L'expérience a donc été poursuivie sur 15 autres individus afin de comparer les profils obtenus par migration sur urine liquide et urine stockée sur papier absorbant et de déterminer si les profils électrophorétiques étaient similaires.

2.2 Comparaison des profils électrophorétiques obtenus par spécimens liquides et spécimens papiers

L'ensemble des résultats obtenus sur les 19 chiens protéinuriques est présenté en Annexe 4.

2.2.1 Exclusion des gels électrophorétiques ininterprétables

Sur les 19 chiens protéinuriques inclus à la fin de l'étude, 11 ont été exclus car les profils électrophorétiques obtenus à partir des urines conservées sur papier absorbant présentaient des bandes électrophorétiques, et plus particulièrement la bande d'albumine, d'une intensité plus faible que les profils obtenus avec les urines liquides et il était impossible de les comparer rigoureusement.



J0

Figure 5. Variation d'intensité des profils électrophorétiques entre l'urine d'un chien liquide ou stockée sur papier.

TA désigne le tracé électrophorétique de l'urine liquide conservée à température ambiante et P celui de l'urine conservée sur papier

La figure 5 présente un des spécimens exclus à J0 : on note une intensité plus faible de la bande d'albumine (69 kDa).

Tableau 4. Tableau récapitulatif des individus inclus dans l'étude

N°inclusion	Nom de l'échantillon	Type de profil	Statut final
1	Procon 2	Glomérulaire	Inclus
2	Procon 4	Glomérulaire	Inclus
3	Procon 5	Glomérulaire	Non interprétable
4	Procon 6	Mixte	Inclus
5	Procon 8	Tubulaire	Non interprétable
6	Procon 11	Glomérulaire	Inclus
7	Procon 12	Albuminurique	Non interprétable
8	Procon 13	Albuminurique	Non interprétable
9	Procon 14	Albuminurique	Non interprétable
10	Procon 15	Mixte	Inclus
11	Procon 16	Glomérulaire	Inclus
12	Procon 19	Glomérulaire	Inclus
13	Procon 20	Mixte	Inclus
14	Procon 21	Tubulaire	Non interprétable
15	Procon 22	Glomérulaire	Non interprétable
16	Procon 23	Tubulaire	Non interprétable
17	Procon 24	Tubulaire	Non interprétable
18	Procon 25	Mixte	Non interprétable
19	Procon 26	Albuminurique	Non interprétable

Sur le tableau 4 figurent en gras les individus conservés à la fin de l'expérience pour lesquels une comparaison entre les tracés électrophorétiques sur spécimen papier et liquide a pu être réalisée.

2.2.2 Interprétation des profils électrophorétiques à J0

Sur les 8 spécimens restants, l'interprétation des tracés électrophorétiques, fondée sur le profil obtenu sur spécimen liquide, a mis en évidence 5 profils glomérulaires et 3 profils mixtes.

Tableau 5. Comparaison des classifications des échantillons d'urine liquides ou conservés sur papier

Nom de l'échantillon	Classification sur spécimen liquide	Classification sur spécimen papier
Procon 2	Glomérulaire	Glomérulaire
Procon 4	Glomérulaire	Glomérulaire
Procon 6	Mixte	Glomérulaire
Procon 11	Glomérulaire	Glomérulaire
Procon 15	Mixte	Glomérulaire
Procon 16	Glomérulaire	Glomérulaire
Procon 19	Glomérulaire	Glomérulaire
Procon 20	Mixte	Mixte

D'après le Tableau 5, pour chaque chien à protéinurie glomérulaire, on n'observe aucune erreur d'interprétation entre le profil obtenu avec l'urine liquide et celui obtenu avec la même urine conservée pendant 2 h sur papier absorbant (J0) : on retrouve le même nombre de bandes protéiques ayant respectivement migré aux mêmes poids moléculaires.

Parmi les 3 chiens à protéinurie mixte, on observe deux individus pour lesquels les bandes de faible poids moléculaire (partie tubulaire) n'apparaissent pas : en interprétant le profil obtenu avec l'urine stockée sur papier ces deux individus auraient été diagnostiqués comme ayant une atteinte glomérulaire et non une atteinte mixte.

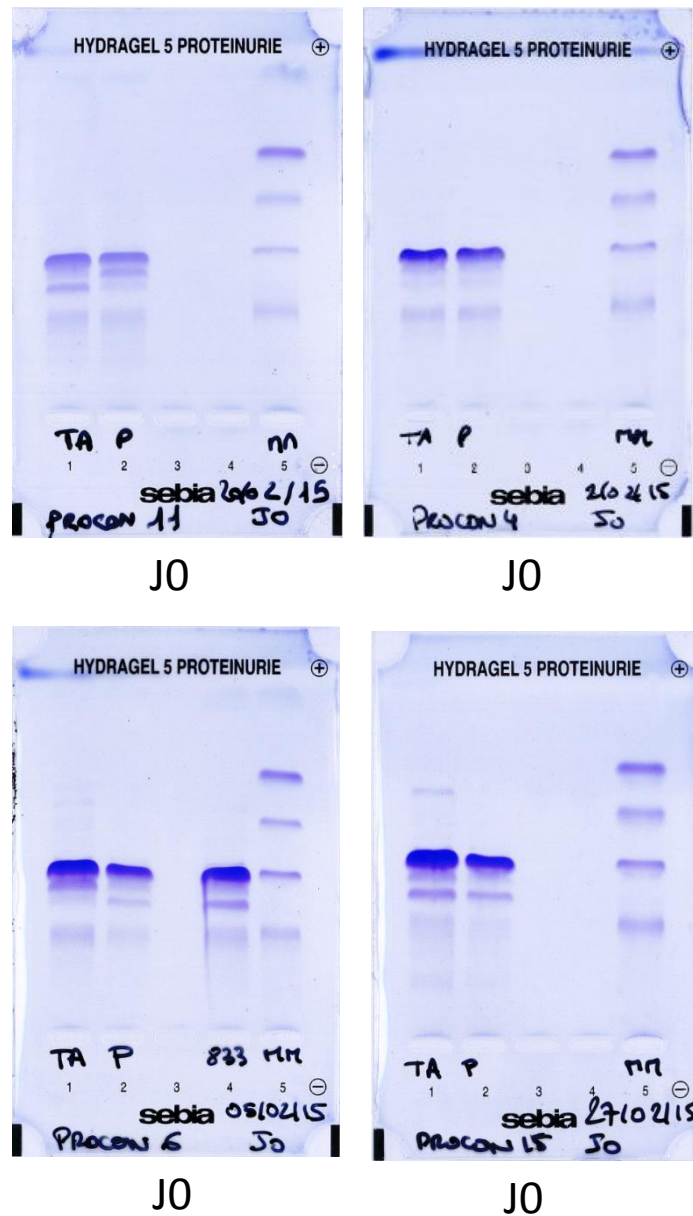
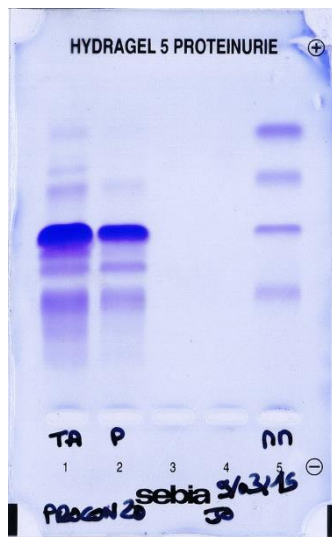


Figure 6. Profils électrophorétiques de quatre chiens protéinuriques à J0
 De haut en bas et de gauche à droite : Procon 11 et Procon 4 (profil glomérulaire), Procon 6
 et Procon 15 (profil mixte)

D'après la figure 6, on observe que pour les deux profils mixtes présentés (Procon 6 et Procon 15), les bandes protéiques de faible poids moléculaire ne sont pas détectées sur spécimen papier tandis que les bandes de protéines de haut poids moléculaire sont identiques entre la migration papier et liquide.



JO

Figure 7. Profil électrophorétique mixte sur spécimen liquide et papier (Procon 20)

Sur les trois profils mixtes obtenus, seul un (Procon 20) présente des bandes tubulaires sur spécimen papier (Figure 7). Néanmoins les 3 bandes de faible poids moléculaire présentes sur le tracé du spécimen liquide ne sont pas toutes visualisées sur le tracé du spécimen papier : sur ce dernier, on observe uniquement la bande protéique de poids moléculaire équivalent à la triose phosphate isomérase (27 kDa).

2.2.3 Variation d'intensité des profils électrophorétiques entre spécimen liquide et papier

Pour les profils glomérulaires et mixtes, on retrouve, pour la partie glomérulaire, le même nombre de bandes protéiques placées aux mêmes poids moléculaires (cf 2.2.3). Cependant l'intensité des bandes protéiques de haut poids moléculaire est légèrement plus faible sur spécimens papiers que sur spécimens liquides pour 6 des 8 animaux.

Pour les profils mixtes, le seul spécimen papier à présenter une partie tubulaire ne présente qu'une seule bande protéique (27 kDa) et celle-ci est de plus faible intensité que sur le spécimen liquide.

2.2.4 Stabilité des profils électrophorétiques sur 5 jours de conservation sur papier absorbant

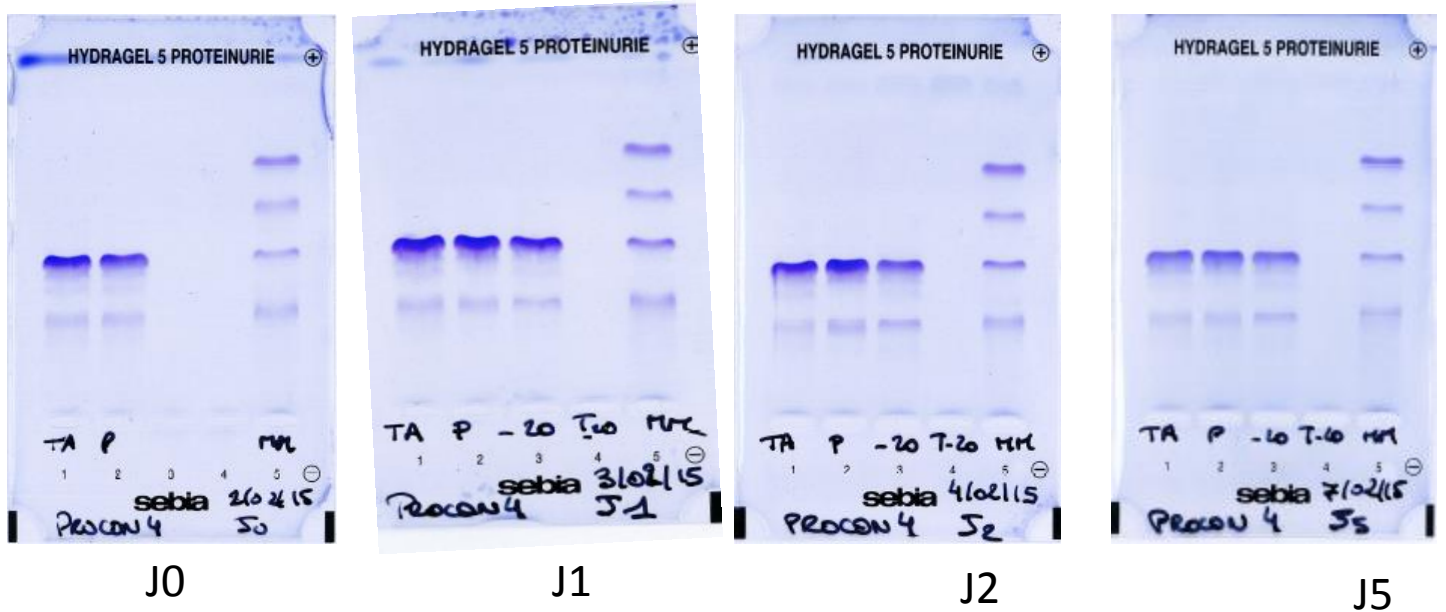


Figure 8. Stabilité du profil électrophorétique du spécimen Procon 4

Hormis l'absence des bandes protéiques de faible poids moléculaire, pour 7 des 8 spécimens étudiés, les profils électrophorétiques des urines conservés sur papier absorbant sont stables à J0, J1, J2 et J5 (Figure 8). On observe toujours le même nombre de bandes glomérulaires avec une intensité quasi identique de J0 à J5. Pour un individu (Procon 15), on observe à J5 une diminution importante de l'intensité du profil électrophorétique de l'urine conservée sur papier (Figure 9).

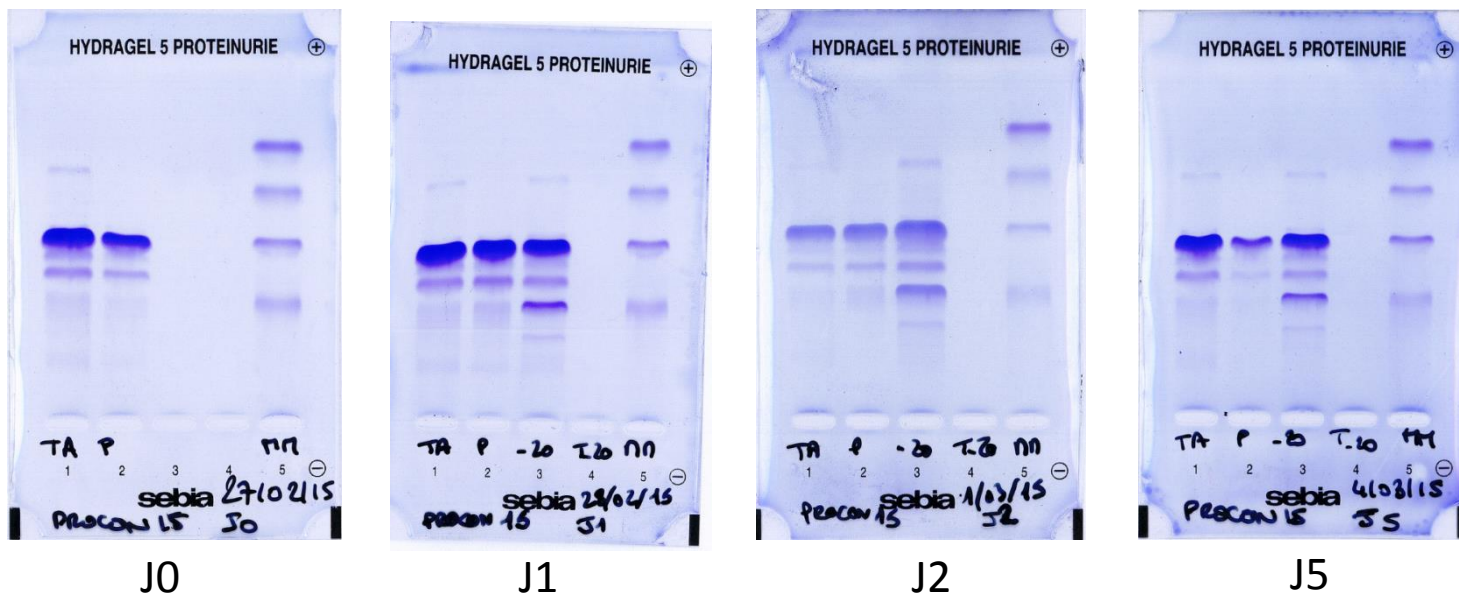


Figure 9. Variation d'intensité au cours du temps des profils sur spécimen papier

En conclusion, d'après les premiers résultats obtenus pour les 8 spécimens inclus, 6 présentent des résultats similaires entre l'électrophorèse sur spécimen liquide et l'électrophorèse sur spécimen papier et ont été à l'origine d'une interprétation identique. De plus, les résultats de l'étude de la stabilité montre des résultats similaires sur 5 jours.

3. Discussion

3.1 Synthèse critique sur les résultats de l'étude

Le but de cette expérimentation était de tester si l'analyse qualitative d'une protéinurie pouvait se faire à partir d'urines conservées sur papier absorbant.

Les étapes préliminaires et l'étude Procon ont montré :

1/ Que la réalisation d'électrophorèse SDS-AGE était possible sur des spécimens d'urine collectés sur papier absorbant conservés plusieurs jours à température ambiante.

Cependant, il est important de mentionner que sur les 19 chiens inclus, 11 ont été exclus car leurs profils électrophorétiques obtenus à partir des urines conservées sur papier absorbant étaient d'une intensité plus faible que les profils obtenus à partir des urines liquides. Deux hypothèses peuvent expliquer ces diminutions d'intensité :

- Des erreurs de mesures de RPCU sur papier : la protéinurie a été fortement surestimée pour un certains nombres d'individus prélevés et la dilution appliquée par suite pour réaliser l'électrophorèse a été par conséquent surestimée

- Une resolubilisation insuffisante de l'urine à partir des spécimens papiers

2/ Que cette technique donne de moins bon résultats pour des protéinuries à faible poids moléculaire (tubulaire et mixte)

Ce dernier point nécessite d'être relativisé : à la fin des expériences, il n'a été possible de comparer les profils électrophorétiques entre spécimen papier et liquide que pour 3 individus à profil mixte et aucun individu à profil tubulaire n'a pu être inclus dans les résultats finaux. Les résultats électrophorétiques ont été insatisfaisants pour 2 de ces 3 individus à profil mixte, pour lesquels les bandes protéiques tubulaires (< 69 kDa) n'ont pas été visualisées. Le dernier individu présente un résultat satisfaisant mais incomplet : même si la visualisation d'une bande de faible poids moléculaire (LWM) a permis d'identifier un profil mixte, celle-ci était d'intensité fortement diminuée et toutes les bandes LWM n'ont pas été détectées.

3.2 Les défauts de l'étude

Les problèmes rencontrés au cours de l'étude sont principalement liés à l'étape de resolubilisation de l'urine stockée sur papier, qui pourrait engendrer une dilution trop importante de la concentration en protéine, et à la mesure de la protéinurie.

1/ Tous les animaux exclus de l'étude après obtention des gels électrophorétiques ont une concentration en protéine sur spécimen liquide < 1700 mg/L alors que les 8 animaux restants ont tous une protéinurie > 1700 mg/L. D'après les résultats des RPCU obtenus sur spécimen papier, la protéinurie est fortement diminuée du fait de la dilution et cela pourrait expliquer la diminution d'intensité des profils.

De même pour les 3 profils mixtes conservés en fin d'expérience, les bandes de faible poids moléculaire observées sur les spécimens liquides ont une intensité faible à modérée (parfois même à l'état de trace). En reliant l'intensité de chaque bande protéique à leur concentration respective, les protéines de faible poids moléculaire des 3 chiens à profil mixte étaient présentes en faible concentration : l'absence de ces bandes protéiques sur spécimen papier pourrait ainsi s'expliquer par une trop faible concentration suite à leur dilution lors de la resolubilisation de l'urine conservée sur papier.

Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser de nouvelles expériences sur des chiens à forte protéinurie, tubulaire et mixte.

2/ Lors des manipulations techniques, de nombreuses erreurs concernant la mesure de la concentration de la protéinurie ont été détectées. Sur chaque spécimen liquide, les mesures ont été répétées deux fois, permettant ainsi d'éliminer les valeurs de protéinurie et de RPCU absurdes. Cependant, le protocole de resolubilisation établi pour notre étude ne nous permettait pas de doubler la mesure des RPCU sur spécimen papier. Des valeurs absurdes de protéinurie n'ont peut-être pas été relevées et des facteurs de dilutions ont pu être appliqués de manière erronée lors de la réalisation des électrophorèses, rendant les profils électrophorétiques sur papier moins intenses et donc ininterprétables. Une nouvelle expérimentation avec une mesure plus fiable de la protéinurie serait donc utile pour vérifier cette hypothèse.

Enfin, la méthode utilisée d'extraction des protéines urinaires devrait être améliorée afin d'éviter leur dilution trop importante lors de la resolubilisation du papier absorbant avec de l'eau distillée, en essayant par exemple de diminuer la quantité d'eau distillée nécessaire au minimum pour qu'il y ait suffisamment de surnageant pour réaliser un RPCU et une électrophorèse. Afin de réaliser un RPCU et une électrophorèse il faut respectivement 200 μ L et 80 μ L de surnageant. En utilisant 0,5 mL d'eau distillée pour la resolubilisation des

spécimens papiers, il restait toujours un surplus de surnageant à la fin des expériences. Ainsi, le volume d'eau distillée nécessaire pourrait être diminué afin de réduire l'effet d'une dilution trop importante sur la quantité de protéine.

CONCLUSION

La première évaluation de cette méthode d'électrophorèses SDS-AGE sur urines conservées sur spécimens papiers a permis d'en démontrer la faisabilité et d'en valider le principe et les grandes lignes techniques. Cette méthode faciliterait et simplifierait le mode de conservation de l'urine d'animaux protéinuriques.

Cette méthode de réalisation d'électrophorèses SDS-AGE sur spécimens urinaires collectés sur papier absorbant présente donc des perspectives intéressantes, surtout dans le cadre d'une caractérisation de la protéinurie d'animaux suspects ou atteints de maladies rénales, mais des études complémentaires sont encore nécessaires afin de la rendre aisée et reproductible en laboratoire puis par le praticien à long terme.

AGREMENT SCIENTIFIQUE


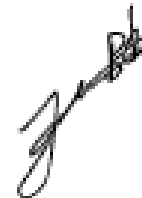
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, *TRUMEL Catherine*, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *RIBLEAU Pauline* intitulée « *Electrophorèse des protéines urinaires à partir d'un spécimen conservé sur papier absorbant* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 5 juin 2015
Professeure Catherine TRUMEL
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse
Jean-Claude BRETHES



Vu :
Le Président du jury :
Professeure Monique COURTADE-SAÏDI



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



Mlle Pauline RIBLEAU
a été admis(e) sur concours en : 2009
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013
a validé son année d'approfondissement le : 18/09/2014
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.


BIBLIOGRAPHIE

- Beatrice , L. et al., 2010. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, Volume 236, pp. 1221-1224.
- Bernard, C., 2001. *Intérêts de l'électrophorèse des protéines urinaires chez le chien*. s.l.:Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
- Bonfanti, U., Zini, E., Minetti, E. & Zatelli, A., 2004. Free Light-Chain Proteinuria and Normal Renal Histopathology and Function in 11 Dogs Exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. *J Vet Intern Med*, Volume 18, pp. 618-624.
- Brown, J. et al., 2010. Comparison of urine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with the renal histological findings and clinicopathological data in dogs with renal disease. *Vet Clin Pathol* 39/4 , pp. 552-569.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2001. Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine specimens. *Approved Guidelines GP16-A2 2nd ed NCCLS*.
- Ehrich, J. & Wurster, U., 1991. Differentiation of proteinurias with electrophoresis. *Pediatric Nephrology*, Volume 5, pp. 376-378.
- Giori, L. et al., 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 Diagnostic Investigation*, Volume 23, pp. 682-690.
- Kania, K. et al., 2010. Urinary proteases degrade albumin: implications for measurement of albuminuria in stored samples. *Annals of Clinical Biochemistry*, Volume 47, pp. 151-157.
- Lee, R. S. et al., 2008. Optimizing sample handling for urinary proteomics. *Journal of proteome research*, Volume 7, pp. 4022-4030.
- Lees, G. E. et al., 2004. Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med*, Volume 19, pp. 377-385.
- Nadaud, C., 2014. *Evaluation d'une nouvelle méthode de mesure du RPCU canin à partir d'urines recueillies sur papier absorbant*. s.l.:s.n.
- Schellenberg, S. et al., 2008. The effects of Hydrocortisone on Systemic Arterial Blood Pressure and Urinary Protein Excretion in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Volume 22, pp. 273-281.
- Schultze, A. & Jensen, R., 1989. Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide Gel Electrophoresis of Canine Urinary Proteins for the Analysis and Differentiation of Tubular and Glomerular Diseases.
- Théron, M. et al., 2013. Effects of storage conditions on canine urine sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis (SDS-AGE). *Veterinary Clinical Pathology*.
- Thongboonkerk, V. & Saetun, P., 2007. Bacterial overgrowth affects urinary proteome analysis: recommendation for centrifugation, temperature, duration, and the use of preservatives during sample collection. *Journal of Proteome Research*, Volume 6, pp. 4173-4181.

Zini, E., Bonfanti, U. & Zatelli, A., 2004. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *American Journal Veterinary Research*, Volume 65, pp. 965-971.

ANNEXES :

1. Annexe 1 : Fiche d'accompagnement de prélèvement

	<p align="center">Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée¹ Unité de Médecine Interne des Carnivores Domestiques²</p> <p align="center">ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France</p> <p>1 ☎ : +33 561 193 831; mail c.trumel@envt.fr 2 ☎ : +33 561 192 319 : mail r.lavoue@envt.fr</p>	<p align="center"><i>FICHE DE RENSEIGNEMENT</i></p>
<p>Etude visant à préciser l'influence du tube et de la durée de conservation dans la modification du profil électrophorétique des protéines urinaires identifiée sur urines conservées à -20°C par électrophorèse sur gel d'agarose sodium sulfate dodécyl (SDS-AGE) chez le chien protéinurique</p>		

Date et heure de prélèvement des urines:

.....
.....

Numéro d'identification pour l'Etude :

.....
.....

Coordonnées du Propriétaire :

Nom :

Adresse :

.....
.....

Signalement de l'animal :

Nom complet:

N° de dossier ENVV :

Date de naissance : Sexe : Stérilisé : Oui Non

Questions Préliminaires :

- Motif de consultation à l'ENVV

.....
.....
.....
.....

.....
.....

- Motif de réalisation de l'analyse d'urine

.....
.....
.....
.....
.....
.....

- Antécédents connus de protéinurie ?

Oui Non

Si oui, a-t-on des précisions sur la méthode de mise en évidence préalable de la protéinurie :

.....
.....
.....
.....


- Hypothèses diagnostiques

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

- Commentaires :

.....
.....
.....
.....
.....
.....

2. Annexe 2 : Fiche d'analyse du prélèvement

	<p align="center">Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée¹ Unité de Médecine Interne des Carnivores Domestiques² ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France 1 ☎ : +33 561 193 831; mail c.trumel@envt.fr 2 ☎ : +33 561 192 319 : mail r.lavoue@envt.fr</p>	<p align="center"><i>FICHE ANALYTIQUE</i></p>
<p align="center">Etude visant à préciser l'influence du tube et de la durée de conservation dans la modification du profil électrophorétique des protéines urinaires identifiée sur urines conservées à -20°C par électrophorèse sur gel d'agarose sodium sulfate dodécyl (SDS-AGE) chez le chien protéinurique</p>		

Numéro d'Identification pour l'Etude :

.....
Informations relatives au prélèvement :

- Volume total d'urine

disponible :

- Date et Heure de prélèvement des urines :

- Heure de dépôt des urines au laboratoire :

- Intervalle < 2 heures respecté ?

Oui

Non

Echantillonnage des urines :

1. **Heure de préparation des papiers absorbants :**

.....

2. **Heure de**

centrifugation :

3. **Heure de rangement à -20°C**

.....

.....

4. Remarques / difficultés :

.....

.....

.....

.....

Analyses immédiates :

- **Densité urinaire :**
- **Bandelette urinaire :**

pH :

Densité :

leucocytes		Sang	
nitrites		Cétones	
urobilinogène		Bilirubine	
protéines		Glucose	

- **Analyse du sédiment :**

Eléments comptés	Cham p 1	Cham p 2	Cham p 3	Cham p 4	Cham p 5	Cham p 6	Cham p 7	Cham p 8	Cham p 9	Champ 10
Cristaux (x100)										
Hématie (x400)										
Leucocytes (x400)										
Cylindres (x100)										
Bactéries										
Spermatoz oïdes										

Conclusions analyse cytologique / Commentaires :

.....
.....
.....
.....

..... RPCU initial :

Protéinurie (mg/L) :.....

Créatinémie (mg/L) :.....

RPCU :

- **SDS-AGE initiales**
 - a. PROCON X J0 TA, PROCON X J0 P
Photocopie couleur à coller ou agraffer à la fiche analytique

- **Remarques / Difficultés :**
.....
.....

Analyses à J0 + 1 jours :

- **Date et heure d'analyse :**
.....

- **SDS-AGE**
 - PROCON X J1 TA, PROCON X J1 P, PROCON X J1 -20
Photocopies couleurs à coller ou agraffer à la fiche analytique

- **Remarques / Difficultés :**
.....
.....
.....
.....

Analyses à J0 + 2 jours :

- **Date et heure d'analyse :**
.....

- **SDS-AGE**
 - **PROCON X J2 TA, PROCON X J2 P, PROCON X J2 -20**
Photocopies couleurs à coller ouagrafer à la fiche analytique

- **Remarques / Difficultés :**

.....
.....
.....
.....

Analyses à J0 + 5 jours :

- **Date et heure d'analyse :**
.....

- **SDS-AGE**
 - a. **PROCON X J5 TA, PROCON X J5 P, PROCON X J5 -20**
Photocopies couleurs à coller ouagrafer à la fiche analytique

- **Remarques / Difficultés :**

.....
.....
.....
.....

Analyses à J0 + 15 jours :

- **Date et heure d'analyse :**
.....

- **SDS-AGE**
 - **PROCON X J15 TA, PROCON X J15 -20**
Photocopies couleurs à coller ouagrafer à la fiche analytique

- **Remarques / Difficultés :**

.....

.....

.....

.....

3. Annexe 3 : Guide d'utilisation du Liquidcheck Urine Chemistry Control, Bio-Rad _ Level 1, Bio RAD Laboratories, Marnes-la-Coquette, France

INSTRUKTIONER I INDHENTNING AF DATASKEMAER

Dataskemaerne er tilgængelige på nettet på www.myinserts.com/64390. Følg anvisningerne på websitet for at modtage e-mail-meddelelser om opdateringer af indlægssedler. Alternative metoder for modtagelse af dataskemaer er ved at kontakte den lokale Bio-Rad Laboratories-forhandler.

FRANÇAIS

UTILISATION

Liquidcheck Urine Chemistry Control est une urine titrée de contrôle de la qualité permettant de surveiller la précision des tests réalisés en laboratoire pour les analytes dont la liste figure sur cette notice.

INTRODUCTION ET PRINCIPE

L'utilisation des produits de contrôle de la qualité est indiquée pour évaluer de façon objective la précision des méthodes et des techniques utilisées et fait partie intégrante des bonnes pratiques de laboratoire. Plusieurs concentrations sont disponibles pour permettre la surveillance de la fiabilité du système d'analyse.

Pour les clients en Allemagne : Des produits de contrôle de qualité sont nécessaires pour l'évaluation des performances de laboratoire comme décrit dans la « Directive pour la garantie de la qualité des tests médicaux de laboratoire selon l'Association Médicale Allemande » (règlement de Rili-BÄK).

RÉACTIF

Ce produit est préparé à partir d'urine humaine avec ajout de produits chimiques, de constituants d'origine humaine et animale, de stabilisants et de conservateurs. Ce produit est fourni sous forme liquide pour un emploi plus aisé.

CONSERVATION ET STABILITÉ

Ce produit restera stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé non ouvert entre 2 et 8 °C.

Une fois ouvert et conservé convenablement fermé entre 2 et 8 °C, ce produit sera stable comme suit :

- Tous les analytes : 30 jours

Ce produit est expédié réfrigéré.

MODE OPÉRATOIRE

Ce produit doit être traité comme les échantillons de patients, en respectant les instructions accompagnant l'appareil, le kit ou le réactif utilisé.

Avant utilisation, amener ce produit à la température ambiante (entre 18 et 25 °C). Homogénéiser le produit en imprimant un léger mouvement de rotation au flacon plusieurs fois. Après chaque utilisation, remettre rapidement le bouchon et conserver le produit entre 2 et 8 °C.

Tout déchet doit être éliminé conformément aux réglementations locales relatives au traitement des déchets. Si le conditionnement est endommagé, contacter le bureau des ventes ou le service technique local de Bio-Rad Laboratories.

LIMITES

1. Ne pas utiliser ce produit après la date de péremption.
2. En cas de contamination microbienne ou de trouble excessif du produit, éliminer le flacon.
3. Ce produit n'est pas conçu pour être utilisé comme étalon.
4. Les valeurs de l'analyte suivant peuvent diminuer progressivement pendant la durée de vie du produit : Créatinine. Les moyennes de chaque laboratoire peuvent se situer en dehors des plages figurant sur les fiches de données.

ATTENTION



Produit d'origine biologique. À considérer comme potentiellement infectieux.

Le sérum de chaque donneur d'urine pour ce produit a été analysé à l'aide de méthodes approuvées par la FDA (Food and Drug Administration, U.S.A.) et a présenté des résultats négatifs pour l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) et les anticorps de l'hépatite C (HtC) et du VIH-1/VIH-2. Il est possible que ce produit contienne d'autres substances d'origine humaine pour lesquelles il n'existe pas de test agréé. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, toute substance d'origine humaine doit être considérée comme potentiellement infectieuse et manipulée avec les mêmes précautions que les échantillons provenant de patients.

Une fiche de sécurité (SDS) est à disposition des utilisateurs professionnels sur le site www.bio-rad.com.

CARACTÉRISTIQUES

Ce produit est un liquide stabilisé fabriqué selon des normes rigoureuses de contrôle de la qualité. Pour obtenir des résultats reproductibles, le contrôle doit être convenablement conservé et manipulé, tel que décrit dans cette notice.

DÉTERMINATION DES VALEURS

Les valeurs moyennes et les plages correspondantes de ± 3 écarts-types indiquées sur les fiches de données des valeurs cibles (Assignment of Values Data Charts, disponibles séparément) ont été déterminées à partir d'analyses répétées et sont propres à ce lot de produit. Les données du programme interlaboratoire Unity™ sont incluses dans la détermination de certaines plages. Les tests indiqués ont été réalisés par le fabricant et/ou par des laboratoires indépendants à l'aide de réactifs validés par le fabricant et sur un échantillonnage représentatif de ce lot de produit. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres plages de valeurs acceptables et de n'utiliser les valeurs fournies qu'à titre indicatif. Pendant la durée de vie de ce contrôle, les plages établies par chaque laboratoire peuvent varier par rapport à celles indiquées. [Nos clients basés en Allemagne doivent se conformer aux exigences du règlement de Rili-BÄK.] Les variations dans le temps et entre laboratoires peuvent être dues à des différences de méthodes, d'appareils et de réactifs employés par chaque laboratoire ou à des modifications de la méthode d'analyse employée par le fabricant.

Le programme interlaboratoire Unity™ est un logiciel appartenant à Bio-Rad contenant plus de 2 milliards de points de données QC provenant de milliers de laboratoires.

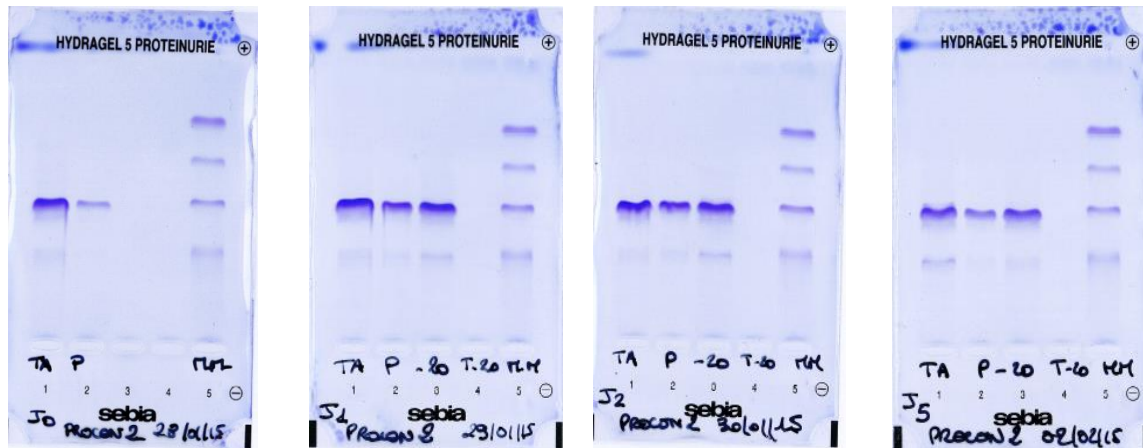
COMMENT OBTENIR LES FICHES DE DONNÉES

Les fiches de données sont disponibles sur Internet, à www.myinserts.com/64390. Suivre les instructions fournies sur le site web pour recevoir par courriel les avis de mise à jour des notices. Contacter l'agence locale Bio-Rad Laboratories pour recevoir les fiches de données par d'autres moyens.

4. Annexe 4 : Résultats RPCU et électrophorétiques des 19 chiens protéinuriques

- **Procon 2**

Femelle, 14 ans et 1 mois, protéine (bandelette): 2+, dU= 1.024

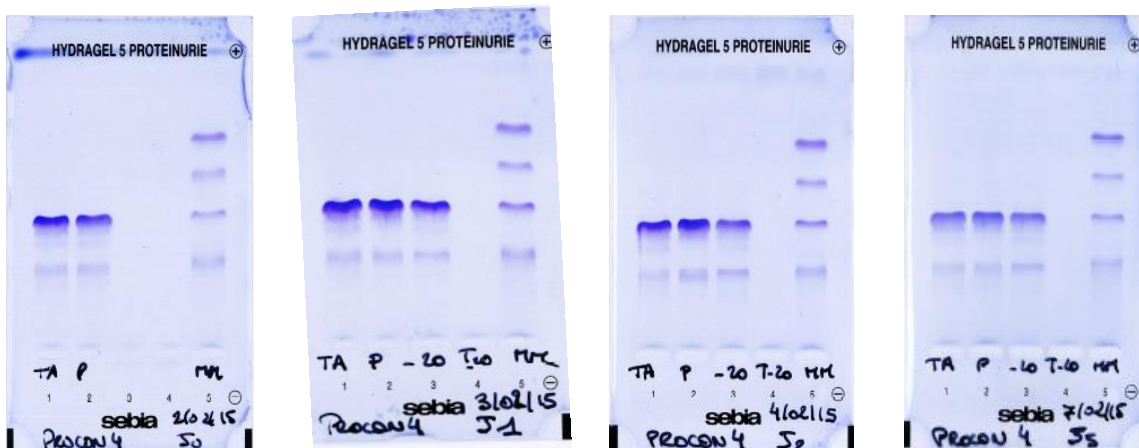


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	2	1789	891	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé

- **Procon 4**

Femelle stérilisée, 8 ans et 1 mois, suivi glomérulopathie

Protéine (bandelette): 2+ à 3+, dU=1.022

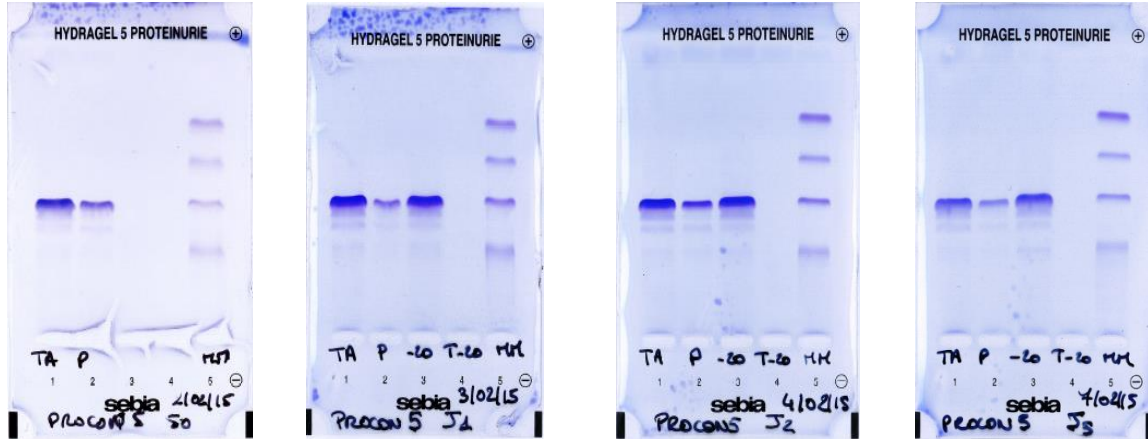


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.94/2.04	2517/2563	1294/1258	2.18	859.6	393,4

- **Procon 5**

Femelle non stérilisée, 14 ans et 11 mois, suivi protéinurie (découverte fortuite).

Protéine (bandelette): 2+, dU=1.014, pH=7

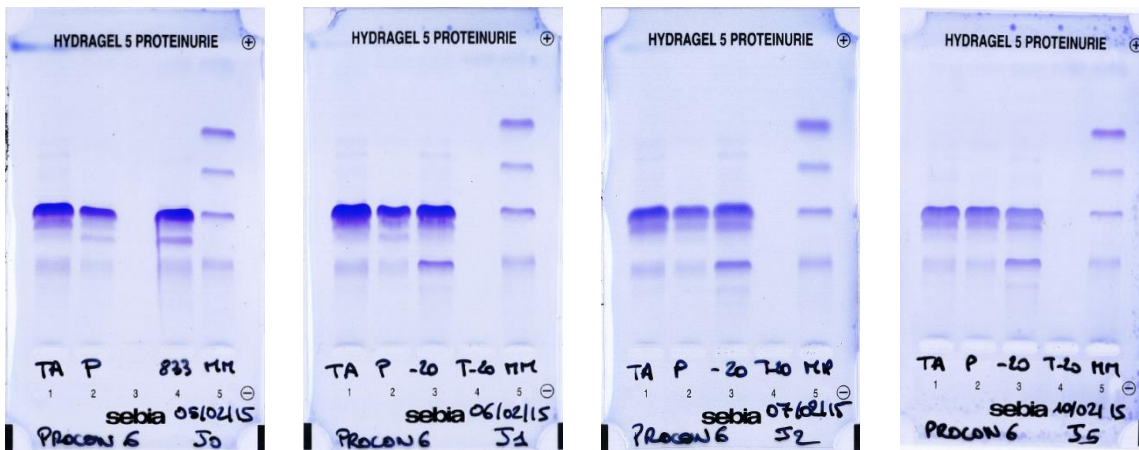


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.91/1.7	1083/1083	567,0/636,4	1.53	436.1	284,3

- **Procon 6**

Femelle stérilisée, 13 ans et 1 mois, suivi maladie rénale chronique

Protéine (bandelette) : 3+, dU=1.026, pH=6

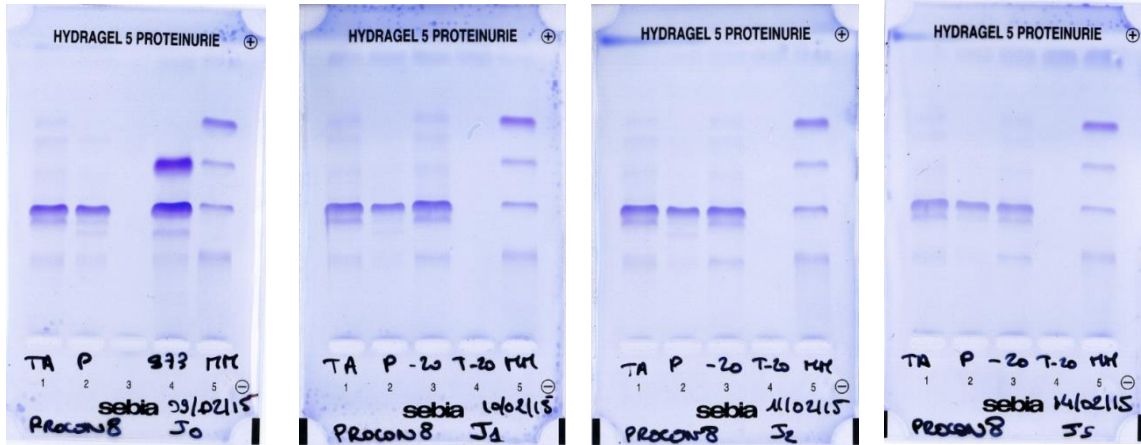


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.85/1.82	2999/3039	1613/1664	3.6	1841	509,1

- **Procon 8**

Femelle stérilisée, 3 ans, suivi MRC

Protéine (bandelette) =2+, dU= 1.012, pH=5

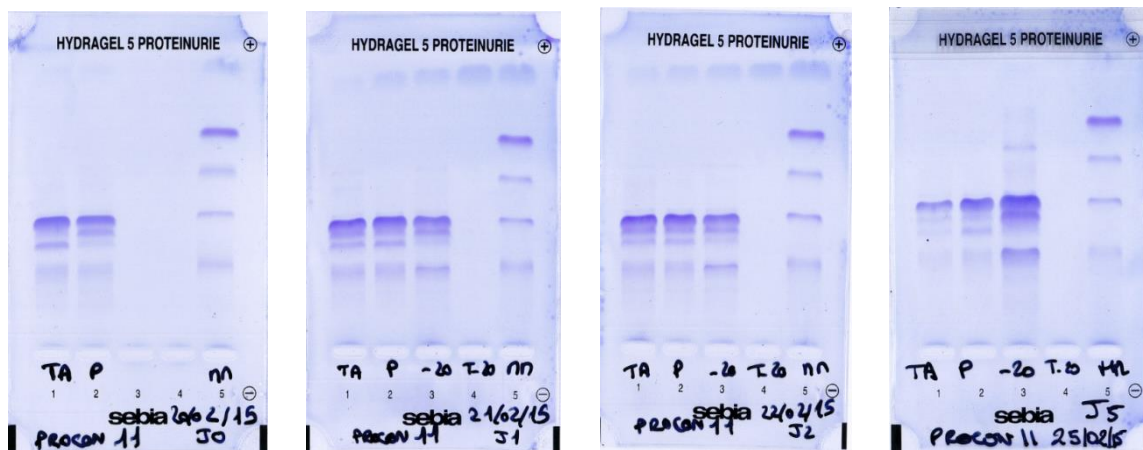


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.41/1.37	1734/1740	1226/1270	1.47	659	448,7

- **Procon 11 :**

Femelle stérilisée, 3 ans et 6 mois, suivi glomérulopathie

Protéine (bandelette): 3+, dU= 1.011, pH=5

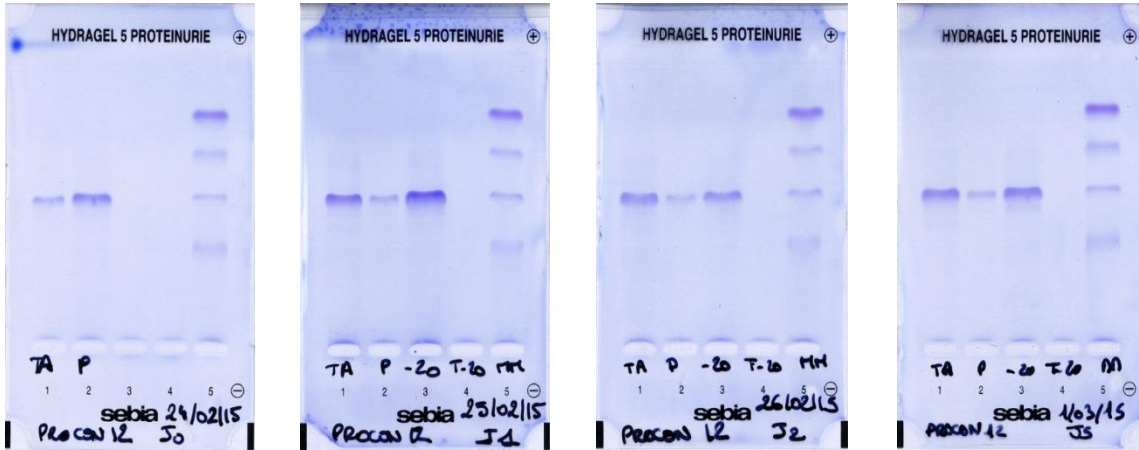


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.41/1.37	1734/1740	1226/1270	1.47	659	448,7

- **Procon 12**

Mâle, 7 ans, suspicion hypercorticisme

Protéine (bandelette): 2+, glucose: 4+, dU=1.020, pH=6

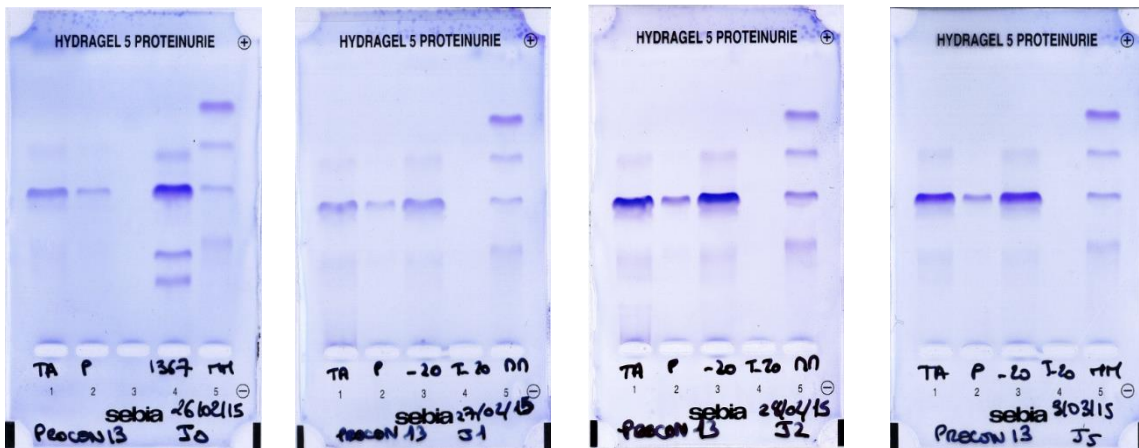


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.9/1.1	1205/690.7	626,8/625,1	1.4	212.9	152,1

- **Procon 13**

Mâle, 8 ans et 6 mois, dilatation estomac

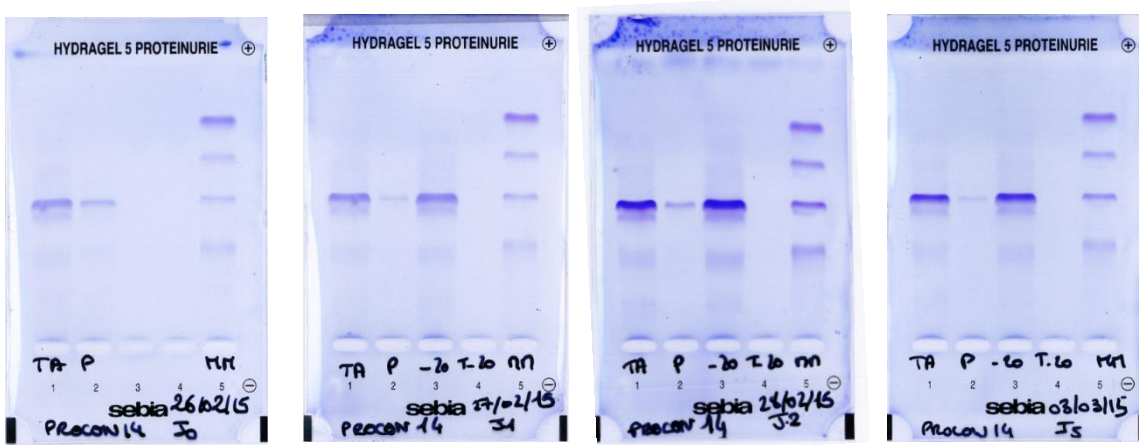
Protéine (bandelette): 2+, sang: 1+, dU=1.030, pH=6



	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	0.70/0.68	784.9/783.1	1118/11501	0.75	277.4	367,0

- **Procon 14**

Mâle castré, 14 ans et 8 mois, suspicion hypercorticisme

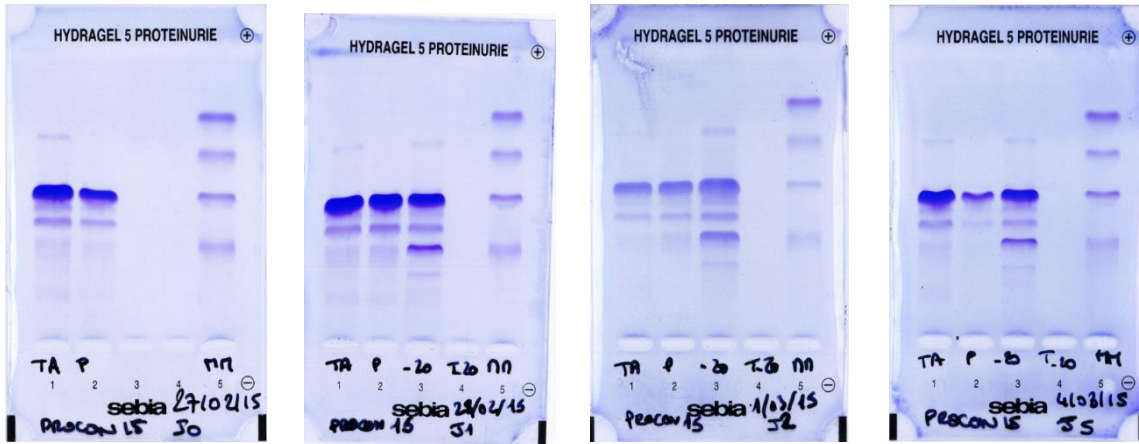


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	0.5/10.5	709.7/14841	1410/1412	0.5	272.8	546,2

- **Procon 15**

Femelle, 11 ans et 10 mois, suivi hypercorticisme

Protéine (bandelette): 2+, dU= 1.020, pH=8

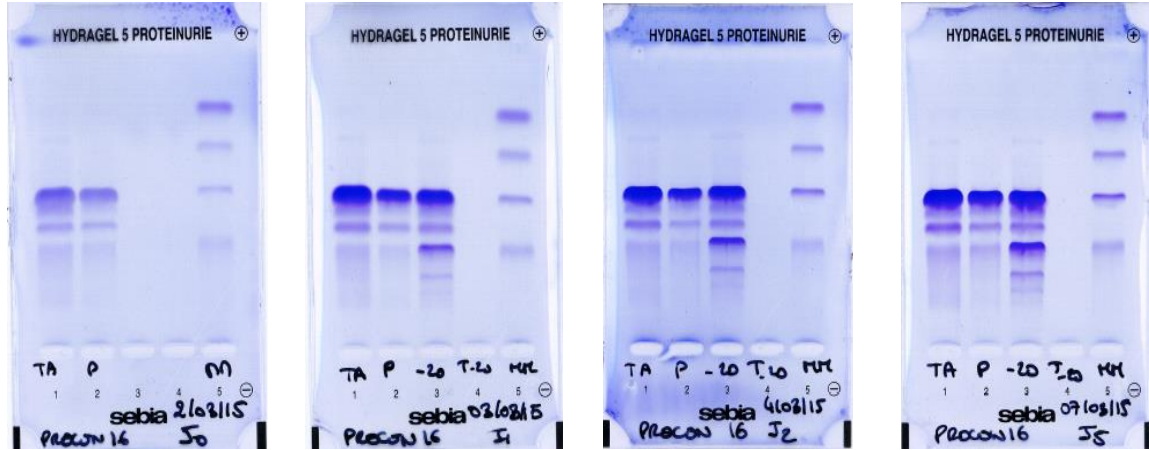


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	8.55/8.23	2837/2849	331,8/346	17.4	2094	119,7

- **Procon 16**

Femelle, 5 ans, suivi hépatopathie

Protéine (bandelette): 3+, sang: 2+, dU= 1.024, pH=8

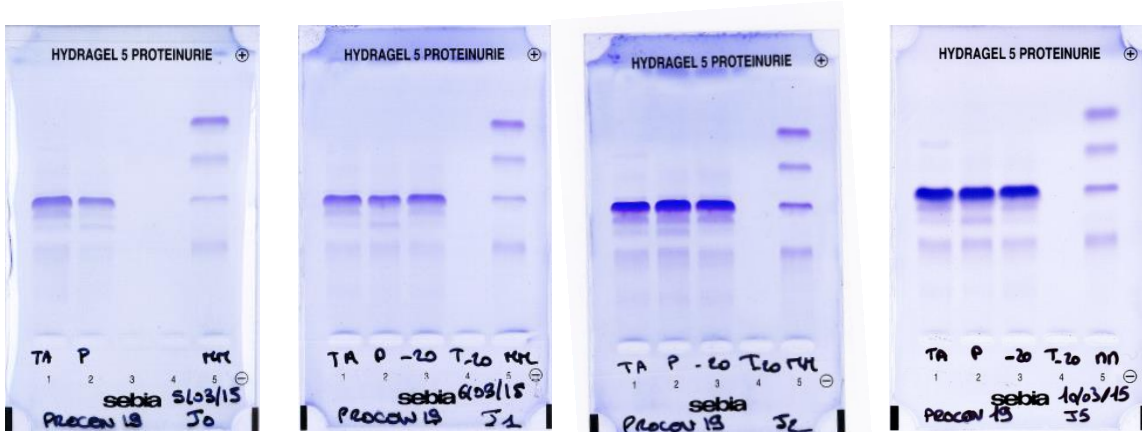


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	4.27/4.63	2821/2948	660/636	12.9	2321	178,6

- **Procon 18**

Mâle castré, 11ans et 7 mois, suivi MRC

Protéine (bandelette): 2+, dU= 1.025, pH= 7

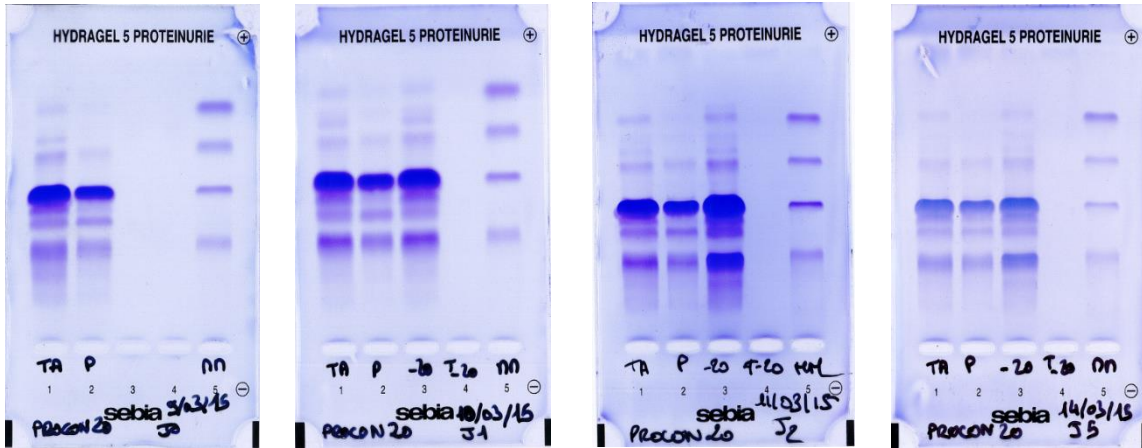


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	3.2/3.2	2536/2545	802.7/800.3	28.1	5497	195.3

- **Procon 20**

Mâle, 7 ans et 3 mois, IRA

Protéine (bandelette): 3+, sang: 3+, dU=1.022, pH=6

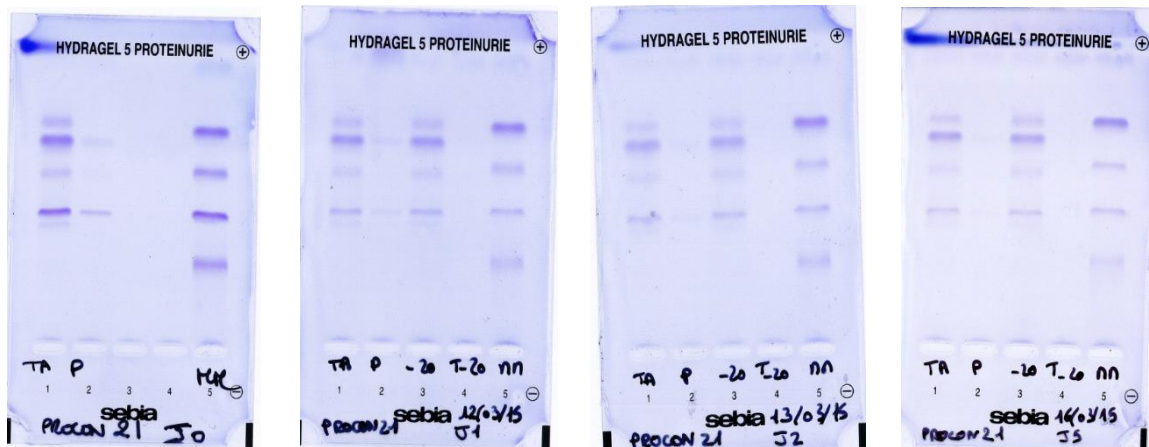


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	11/2	14700/2748	1315/1377	5.6	2241	395.3

- **Procon 21**

Femelle non stérilisée, 3 ans et 2 mois,IRA

Protéine (bandelette): 1+, dU= 1.005, pH=5

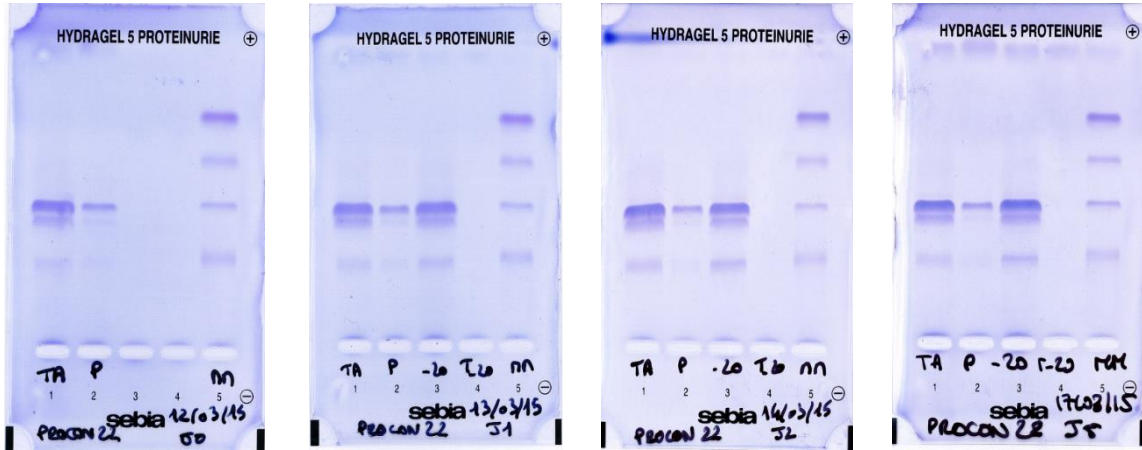


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.11/1.08	385.9/398.6	347.6/367.6	1.23	100.8	82.09

- **Procon 22**

Femelle non stérilisée, 3 ans et 2 mois, dysplasie rénale et MRC

Protéine (bandelette): 2+ à 3+, sang: 2+, dU=1.035, pH=5

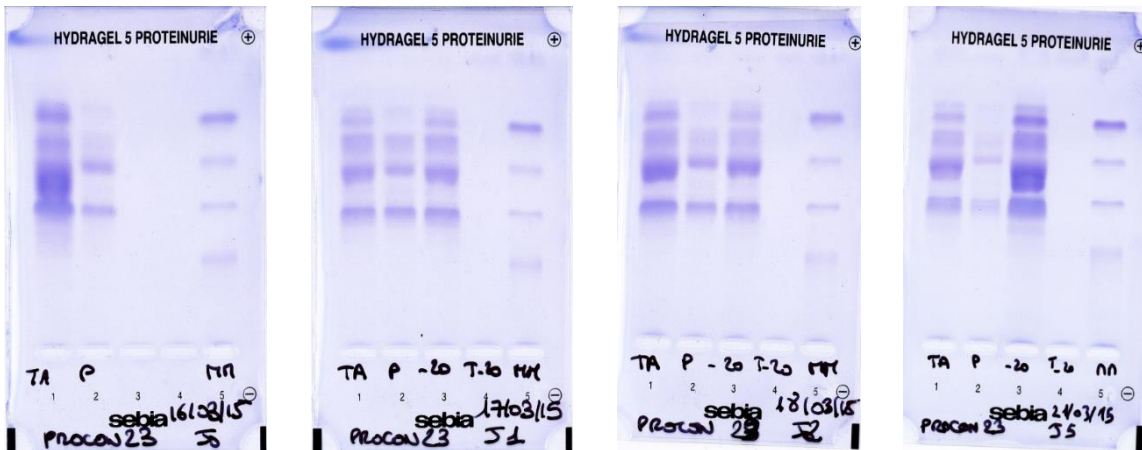


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	0.69/0.62	1273/1187	2004/2057	11.4	6039	528.1

- **Procon 23**

Mâle, 6 mois, traitement au méloxicam depuis plusieurs mois

Protéine (bandelette): 2+, sang: 1+, dU=1.018, pH=7

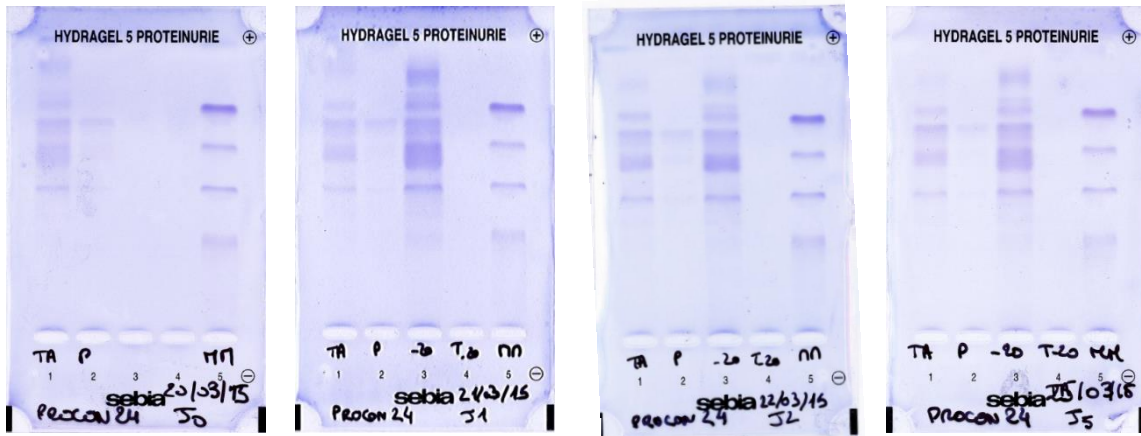


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	5.96/2.43	2416/1024	405/420.7	160	580.5	3.622

- **Procon 24**

Mâle, 12 ans et 10 mois, Anémie Hémolytique et traitement au meloxicam

Protéine (bandelette): 1+, dU=1.008, pH=7

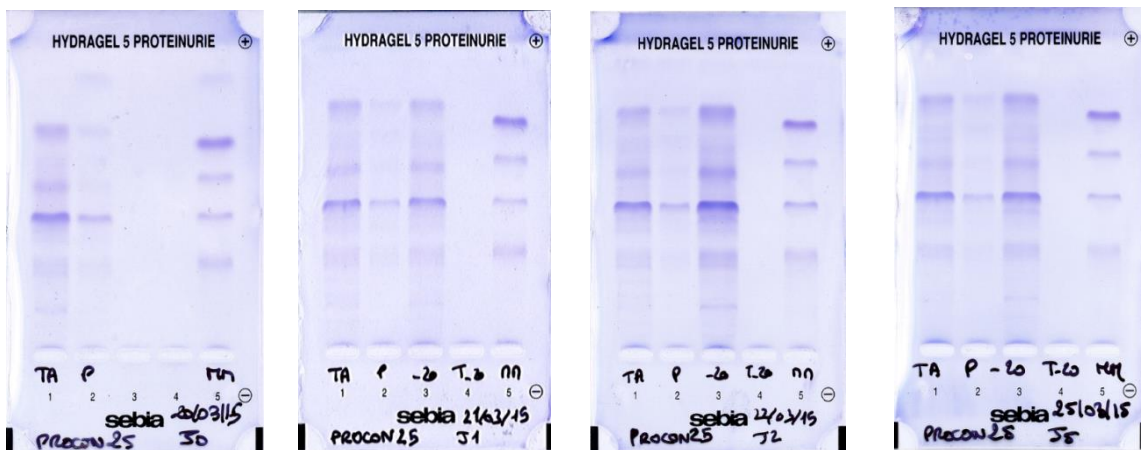


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	3.93/57.6	732.8/11071	186.5/191.9	4.5	132.9	29.57

- **Procon 25**

Femelle stérilisée, 12 ans et 2 mois, IRA

Protéine (bandelette): 2+, sang: 1+, pH=7, dU= 1.022, pH=7

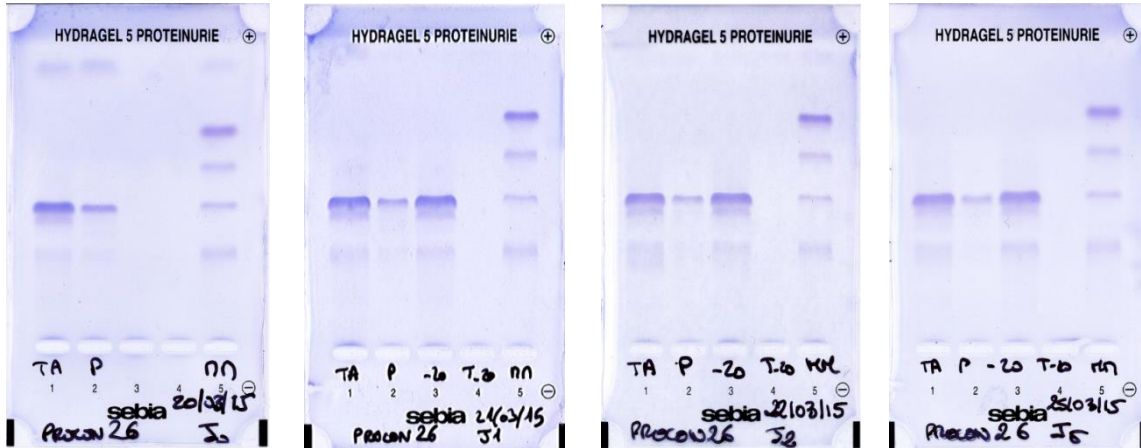


	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.08/1.11	1214/1211	1125/1089	1.44	376.5	260.7

- **Procon 26**

Femelle stérilisée, 14 ans et 11 mois, suivi protéinurie (IECA)

Protéine (bandelette): 2+, dU= 1.031, pH= 7



	TA (RPCU)	TA (prot) en mg/L	TA (créat) en mg/L	Papier(RPCU)	Papier (prot) en mg/L	Papier (créat) en mg/L
J0	1.02/1.04	1107/1108	1084/1064	1.32	351.4	265.5

Toulouse, Juin 2015

Nom : Ribleau

Prénom : Pauline

Titre : Électrophorèse des protéines urinaires à partir d'un spécimen conservé sur papier absorbant

Résumé : Le manuscrit présente une rapide synthèse bibliographique sur la technique de l'électrophorèse des protéines urinaires, ses facteurs de variation pré-analytique et analytique ainsi que ses critères d'interprétation. Le travail expérimental a consisté en la comparaison électrophorèse SDS-AGE de protéines urinaires à partir d'urines conservées sur papier absorbant à température ambiante et sur urines liquides conservées à température ambiante. Cette étude a démontré la faisabilité de cette nouvelle méthode et en a validé les principes et grandes lignes techniques. Celle-ci faciliterait et simplifierait le mode de conservation de l'urine d'animaux protéinuriques.

Mots-clés : électrophorèse des protéines urinaires, protéinurie, chien, urines, pré-analytique.

Title : Urine electrophoresis on urine stored on absorbent paper

Abstract : In a first part, a short literature review has been carried out on canine urine electrophoresis, pre-analytic and analytic factors of variation as well as the criteria for interpretation. In a second part, the study consisted in a comparison of SDS-AGE electrophoresis on urine stored on absorbent and liquid urines stored at room temperature. This study demonstrated the feasibility of this new method and validated its main principles and technical lines. The major interest of this method is to simplify the storage condition of urine in proteinuric dogs.

Keywords: Urine electrophoresis, proteinuria, dog, urine, pre-analytical factors.