



HAL
open science

Étude rétrospective sur l'influence du mode de collecte des urines sur le profil électrophorétique sur le gel d'agarose des protéines urinaires chez le chien

Mathilde Lajoinie

► **To cite this version:**

Mathilde Lajoinie. Étude rétrospective sur l'influence du mode de collecte des urines sur le profil électrophorétique sur le gel d'agarose des protéines urinaires chez le chien. Médecine vétérinaire et santé animale. 2018. dumas-04540186

HAL Id: dumas-04540186

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04540186v1>

Submitted on 10 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ETUDE PROSPECTIVE SUR L'INFLUENCE DU MODE DE COLLECTE DES URINES SUR LE PROFIL ELECTROPHORETIQUE SUR LE GEL D'AGAROSE DES PROTEINES URINAIRES CHEZ LE CHIEN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Mathilde LAJOINIE

Née, le 30 décembre 1993 à REIMS (51)

Directeur de thèse : Mme Rachel LAVOUE

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Rachel LAVOUE

Mme Catherine TRUMEL

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- 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. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- 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. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- 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 **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

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 **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEGER Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*



REMERCIEMENTS

A Madame la professeure Monique COURTADE-SAÏDI,

Professeure des universités et praticien hospitalier à la faculté de médecine de Rangueil,
Histologie et cytologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,
Pour votre disponibilité et votre sympathie,
Sincères remerciements.

A Madame la Docteur Rachel LAVOUE,

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Médecine interne

Pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail et de se rendre disponible,
Pour ses conseils avisés et sa précieuse expertise,
Mes hommages respectueux.

A Madame la Professeure Catherine TRUMEL,

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Biologie médicale et comparée

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de s'intéresser à ce projet,
Toute ma reconnaissance.

Au personnel du laboratoire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour le travail technique et la patience dont ils ont fait preuve.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES TABLEAUX	9
TABLE DES FIGURES	9
TABLE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
A. L'électrophorèse en médecine vétérinaire	15
1. Les techniques de l'électrophorèse	15
a) Migration en fonction de la charge	15
b) Migration en fonction de la masse moléculaire	15
c) Immunofixation	16
2. Utilisation et accessibilité des différents types d'électrophorèse urinaires en médecine vétérinaire	16
B. Exploration de la protéinurie rénale	16
1. La protéinurie	16
a) Du sang à l'urine	16
b) L'origine d'une protéinurie : pré-rénale, rénale et post-rénale	17
c) Origine de la protéinurie rénale	18
2. Mise en évidence d'une protéinurie	18
a) Méthodes semi-quantitatives	18
b) Méthodes quantitatives	19
3. Origine de la protéinurie	20
a) Histologie	20
b) Marqueurs biologiques urinaires	21
c) Electrophorèse des protéines urinaires	22
C. Données actuelles concernant l'électrophorèse des protéines urinaires chez le chien	24
1. Emploi de l'électrophorèse des protéines urinaires en médecine vétérinaire	24
a) Affections rénales	24
b) Utilisation de l'électrophorèse des protéines urinaires en recherche clinique	24
c) Myélome multiple	25
d) Infection du tractus urinaire et maladie rénale chronique	26
2. Influence des facteurs pré-analytiques et analytiques sur l'électrophorèse des protéines urinaires	26
a) Influence de la durée et de la température de conservation	26
b) Influence du mode de prélèvement	28
c) Influence du sexe de l'animal	29
d) Influence du moment de lecture du gel	29
e) Influence du stress du sujet	30
f) Influence de l'heure du prélèvement	30
g) Influence de la concentration des urines	31

SECONDE PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	33
A. Contexte et objectifs	34
B. Matériel et méthodes	36
1. Animaux	36
a) Critères d'inclusion	36
b) Critère d'exclusion	36
c) Préparation des chiens sélectionnés	36
d) Prélèvements urinaires	37
i. Miction spontanée simple	37
ii. Miction spontanée après nettoyage de la sphère uro-génitale	37
iii. Cystocentèse écho-guidée	37
2. Etapes pré-analytiques	38
a) Préparation des urines	38
b) Délai entre collecte et analyse du culot au Laboratoire Central	38
c) Centrifugation	39
d) Aliquotage et préparation des spécimens liquides	39
e) Stockage des urines entre collecte et analyses ultérieures	39
f) Remise en suspension du sédiment	40
3. Etapes analytiques immédiates	40
a) Bandelettes urinaires	40
b) Densité urinaire	40
c) Examen cytologique du sédiment	40
i. Analyse préliminaire au faible grossissement	41
ii. Analyse au fort grossissement	41
iii. Examen cytologique après coloration	42
4. Détermination du RPCU	43
5. SDS-AGE sur spécimen liquide	43
a) Réalisation	43
b) Interprétation des résultats	45
6. Statistiques	46
C. Résultats	47
1. Description de la population	47
a) Motifs d'inclusion	47
b) Motifs d'exclusion	47
c) Epidémiologie de la population	47
2. Collecte des urines	48
3. Electrophorèse des protéines urinaires	48
a) Influence du mode de collecte sur l'électrophorèse des protéines urinaires	48
b) RPCU <i>versus</i> électrophorèse des protéines urinaires	49
c) Densité et électrophorèse des protéines urinaires	50
d) Concentration en protéines urinaires et électrophorèse des protéines urinaires	50
D. Discussion	51
CONCLUSION	55
BIBLIOGRAPHIE	57

ANNEXES	63
ANNEXE 1 : Formulaire de consentement éclairé	63
ANNEXE 2 : Fiche d'accompagnement de prélèvements	64
ANNEXE 3 : Fiche d'analyse	66
ANNEXE 4 : Extrait du tableur de résultat	72
ANNEXE 5 : Exemple de gels d'électrophorèse	73

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Bilan des recommandations pré-analytiques pour la réalisation d'une électrophorèse des protéines urinaires chez le chien.	35
TABLEAU 2 : Dénombrement des éléments d'intérêt sur 10 champs distincts pour chaque spécimen. Examen réalisé au microscope optique, grossissement x400, entre lame et lamelle.	42
TABLEAU 3 : Répartition des gabarits en fonction du sexe des individus de l'étude.	47
TABLEAU 4 : Confrontation des résultats de l'électrophorèse des protéines urinaires (EPU) au rapport des protéines sur créatinine urinaires (RPCU) pour chaque spécimen quelque soit son mode de prélèvement. Les résultats sont exprimés en nombre de spécimens.	49
TABLEAU 5 : Influence de la densité urinaire sur le profil électrophorétique des protéines urinaires.	50
TABLEAU 6 : Influence de la concentration en protéines urinaires sur le profil électrophorétique des protéines urinaires.	51

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : Gel d'électrophorèse de type SDS-AGE du spécimen CN20.	44
FIGURE 2 : Gels d'électrophorèse de type SDS-AGE du spécimen CN13 en fonction du contraste et de la luminosité de l'image.	46

TABLE DES ABREVIATIONS

ACVIM : *American College of Veterinary Internal Medicine*

CYS : cystocentèse

DFG : débit de filtration glomérulaire

ENVT : *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

EPU : Electrophorèse des protéines urinaires

HRE : High resolution electrophoresis

IRIS : *International Renal Interest Society*

ITU : Infection du tractus urinaire

IgG : Immunoglobuline G

Da : Dalton

MAN : Miction spontanée avec nettoyage

MAS : Miction spontanée simple

MRC : Maladie rénale chronique

n.d. : Non daté

RPCU : Rapport protéines sur créatinine urinaires

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-AGE : Sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

INTRODUCTION

La protéinurie est fréquente en médecine vétérinaire. Elle est associée à de nombreuses causes et doit toujours être explorée. Après exclusion des causes extra-rénales, il convient de localiser l'atteinte rénale à l'origine de la fuite de protéines. Pour ce faire, l'examen de choix est l'analyse histologique du parenchyme rénal par réalisation de biopsies. Néanmoins, cet examen est invasif et présente des risques non négligeables. Par ailleurs le recours à la microscopie électronique (peu disponible) est souvent indispensable pour la bonne interprétation lésionnelle et l'examen histologique ne permet pas de révéler des anomalies fonctionnelles – tubulaires notamment (Lees et al., 2011 ; IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup et al., 2013).

En conséquence, des techniques moins invasives ont été développées. Parmi celles-ci, l'électrophorèse des protéines urinaires permet de définir l'atteinte rénale en fonction de la masse moléculaire des protéines présentes dans les urines. Cette technique étant non invasive et peu coûteuse, elle peut permettre la réalisation d'un suivi régulier de l'évolution de l'affection rénale à l'origine de la protéinurie. Il s'agit d'une méthode très sensible mais de spécificité variable en fonction des études (Brown et al., 2010 ; Schultze and Jensen, 1989 ; Zini et al., 2004). Or, il existe très peu d'études concernant ses étapes pré-analytiques ou les principes de lecture des gels. Cette absence de standardisation des protocoles pourrait être à l'origine des variations de spécificité constatées dans la littérature.

Parmi ces conditions pré-analytiques, le mode de collecte des urines occupe une place importante. Effectivement il est actuellement recommandé en médecine vétérinaire d'utiliser un prélèvement obtenu par cystocentèse afin de réaliser une analyse urinaire complète (Lees et al., 2005). Cette technique présente des avantages certains : le prélèvement est obtenu quasiment stérilement et affranchi des contaminations des voies basses du tractus urinaire. Cependant, c'est un acte nécessitant une consultation chez le vétérinaire et présentant un caractère invasif ; il participe donc au stress de l'animal et augmente les frais liés au suivi de la protéinurie rénale pour les propriétaires.

Dans cette thèse, nous étudions une alternative au prélèvement des urines par cystocentèse en comparant les électrophorèses des protéines urinaires de prélèvements collectés par miction naturelle avec ou sans nettoyage de la sphère uro-génitale préalable et cystocentèse. L'objectif est double. D'une part il s'agit de clarifier les conditions pré-analytiques nécessaires à la réalisation d'une électrophorèse des protéines urinaires ; d'autre part, la validation d'un protocole à partir d'urines collectées par miction naturelle permettrait un plus grand confort aux

propriétaires et à leur animal dans la réalisation du suivi de l'affection rénale de ce dernier.

Dans une première partie, nous étudierons la place de l'électrophorèse des protéines urinaires dans la prise en charge du chien protéinurique, puis nous réaliserons un bilan des conditions pré-analytiques nécessaires à la réalisation de ce type d'analyse. Dans une seconde partie, nous tenterons de déterminer l'influence du mode de collecte des urines sur leur profil électrophorétique.

PREMIERE PARTIE :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. L'électrophorèse en médecine vétérinaire

1. Les techniques de l'électrophorèse

L'électrophorèse permet la séparation de particules chargées en fonction de leur vitesse de migration sous l'action d'un champ électrique (Lafont, n.d.). Différents types d'électrophorèse sont utilisés en médecine, ils varient en fonction du milieu de migration et de la préparation préalable des échantillons. Nous présenterons ici les différents types utilisés pour étudier la protéinurie chez le chien.

a) Migration en fonction de la charge

En l'absence de traitement préalable, les protéines migrent en fonction de leur charge lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. Il est possible d'améliorer les performances de cette méthode par utilisation d'un support d'agarose supplémenté en ions calcium que l'on soumet à un haut voltage, on parle alors d'électrophorèse à haute résolution (HRE) (Gurske et al., 1989). Cette méthode est très rapide, automatisée et peu coûteuse (Giori et al., 2011).

b) Migration en fonction de la masse moléculaire

Le traitement d'un échantillon avec du Sodium dodécyl sulfate (SDS) permet de charger uniformément les particules, leur migration est alors uniquement fonction de leur masse moléculaire. Schématiquement, la rapidité de migration des protéines est inversement proportionnelle à leur masse moléculaire – plus les protéines sont lourdes, moins elles migrent rapidement (Lafont, n.d.). C'est une technique très employée pour la réalisation des électrophorèses des protéines, ne nécessitant pas de concentration préalable des échantillons (Camaré and Caussé, 2013). Les gels utilisés comme supports migratoires sont majoritairement de deux types : le gel de polyacrylamide et le gel d'agarose.

Le gel de polyacrylamide (PAGE) est long et relativement peu aisé à préparer, il s'agit d'un gel très fragile et doit donc être manipulé avec grande précaution. Il est également toxique pour les manipulateurs. En revanche il permet l'obtention de bandes fines et bien délimitées, de plus, il est possible de contrôler l'aspect de ces bandes en jouant sur la taille des puits. Il permet préférentiellement la séparation des protéines de faible masse moléculaire (Barril and Nates, 2012).

Le gel d'agarose (AGE) est simple et rapide à préparer, relativement facile de manipulation et permettant la migration d'une large gamme de protéines – majoritairement de moyennes à hautes masses moléculaires. Néanmoins la largeur des pores n'est pas contrôlable, les bande sont souvent mal délimitées et relativement floues (Barril and Nates, 2012).

c) Immunofixation

Après migration des protéines, il est possible de réaliser une immunofixation en utilisant la technique du Western Blot afin de mettre en évidence certaines protéines recherchées. C'est notamment le cas lors de recherche de protéinurie de Bence Jones (chaines légères d'immunoglobulines) en médecine humaine, l'immunofixation permet alors la distinction entre protéine de Bence Jones et protéine sérique monoclonale (Jenkins, 2009). Cette technique est également utilisée pour rechercher des marqueurs de différents types de protéinurie (Yalçin and Cetin, 2004).

2. Utilisation et accessibilité des différents types d'électrophorèse urinaires en médecine vétérinaire

Les trois types d'électrophorèse précités (HRE, SDS-PAGE, SDS-AGE) permettent de réaliser convenablement une électrophorèse des protéines urinaires. Néanmoins, pour cette utilisation, l'électrophorèse sur SDS-AGE est préférée aux autres techniques par une majorité de scientifiques. Effectivement, malgré l'aspect concentration-dépendant des bandes qu'il produit, il représente le meilleur compromis entre la toxicité du SDS-PAGE et le manque de sensibilité de la HRE (Giori et al., 2011).

A l'heure actuelle, le manque de marqueurs validés limite l'utilisation de l'immunofixation au cadre de la recherche médicale (Yalçin and Cetin, 2004 ; Zaragoza et al., 2004).

B. Exploration de la protéinurie rénale

1. La protéinurie

a) Du sang à l'urine

Les reins agissent comme un filtre, permettant l'élimination sous forme d'urine de

nombreux éléments que le corps n'utilise pas. La barrière de filtration glomérulaire laisse passer sélectivement les molécules en fonction de leur masse moléculaire (inférieure à 68 kDa), leur charge (le passage des éléments neutres ou chargés positivement est favorisé) et leur conformation dans l'espace. Les molécules ayant traversé le filtre glomérulaire se trouvent alors dans les tubules rénaux, sous forme d'urine primitive. La composition des urines est modifiée dans ce secteur par réabsorption et sécrétion de nombreuses molécules. Finalement, une grande partie des électrolytes, de l'eau, du glucose, des acides aminés et des petites protéines sont réabsorbées. Les urines sont composées de 99% d'eau, de très peu de protéines (0,1 à 2 g/L de façon physiologique) et de dérivés azotés tels que l'urée et l'ammoniac (Lefebvre, n.d.). Par ailleurs, l'albumine qui a des propriétés intermédiaires, c'est-à-dire moléculaire de 69 kDa et une charge négative est filtrée en faible quantité par les glomérules et réabsorbée par les tubules, elle est physiologiquement présente dans les urines du chien à une concentration inférieure à 1 mg/dL (Grauer, 2011).

b) L'origine d'une protéinurie : pré-rénale, rénale et post-rénale

On parle de protéinurie lorsque la concentration en protéines contenues dans les urines dépasse le seuil physiologique. Celle-ci peut être d'origine pré-rénale, rénale ou post-rénale. La protéinurie pré-rénale est due à la présence anormale dans le plasma de protéines qui traversent la barrière de filtration glomérulaire alors que celle-ci n'est pas altérée ; par exemple, c'est le cas de l'hémoglobine, de la myoglobine ou encore des protéines de Bence-Jones (chaines légères d'immunoglobulines). La protéinurie post-rénale est due à la pénétration de protéines dans l'urine après que celle-ci ait quitté le bassin ; il peut s'agir de protéines issues des parois du tractus urinaire ou du tractus génital au gré d'hémorragie ou d'inflammation. Enfin, la protéinurie rénale est due à un défaut de gestion des protéines plasmatiques par le rein qui peut être fonctionnelle – en réponse à des phénomènes physiologiques transitoires tels qu'un effort intense ou un état fébrile – et sera dans ce cas transitoire, ou pathologique – révélatrice de lésions ou dysfonctions rénales – et sera alors persistante (Lees et al., 2005).

Lors de la mise en évidence d'une protéinurie, la principale problématique est de savoir si celle-ci est révélatrice de lésions rénales ou non, c'est-à-dire rénale pathologique selon la classification établie par le consensus ACVIM concernant la mise en évidence et la prise en charge de la protéinurie (Lees et al., 2005). Pour cela, les autres types de protéinuries devront être écartées. La protéinurie post-rénale peut être écartée d'une part en prélevant les urines par cystocentèse afin de se prévaloir des protéines d'origines génitales et d'autre part en écartant

toute inflammation du tractus urinaire (échographie, absence de signes urinaires type pollakiurie, culot urinaire et culture bactériologique au besoin). La protéinurie pré-rénale peut être écartée si la concentration plasmatique en protéines totales est dans les limites des valeurs usuelles. Enfin, la protéinurie rénale fonctionnelle peut être écartée par démonstration de la persistance de la protéinurie – c'est-à-dire la mise en évidence de celle-ci au minimum 3 fois à au moins 2 semaines d'intervalle entre chaque évaluation (Lees et al., 2005).

c) Origine de la protéinurie rénale

La protéinurie rénale pathologique peut être d'origine variée (Lees et al., 2005) :

- Glomérulaire, en cas d'altération de la barrière de filtration glomérulaire qui permet alors le passage dans les urines de protéines normalement non filtrées, soit parce que leur masse est supérieure à 68 kDa ou parce qu'elles sont de taille intermédiaire mais chargées négativement – on parle de glomérulopathie ;
- Tubulaire, en cas d'altération des mécanismes de réabsorption des protéines normalement filtrées et réabsorbées, il y a alors une accumulation de protéines de faible masse moléculaire dans les urines – on parle de tubulopathie ;
- Interstitielle, en cas d'inflammation des voies rénales à l'origine de l'exsudation de protéines dans les voies urinaires – c'est de cas lors de néphrite active. C'est un cas particulier qui implique la présence de signes cliniques compatibles avec une néphrite et la mise en évidence d'un processus inflammatoire pour être diagnostiqué. Il ne rentre pas dans la dichotomie classique de l'origine de la protéinurie rénale et est à exclure après avoir écarté les protéinuries pré-rénale et post-rénale.

Dans la suite de ce manuscrit, nous ne parlerons que des lésions glomérulaires et tubulaires comme source de protéinurie. Il est par ailleurs à noter que ces deux mécanismes peuvent coexister, on parle alors de protéinurie mixte.

2. Mise en évidence d'une protéinurie

a) Méthodes semi-quantitatives

La bandelette urinaire réalisée lors de toute analyse urinaire permet une pré-sélection des animaux protéinuriques. Cependant, des réactions faussement négatives sont mises en évidence lors de protéinurie de Bence Jones ou d'une faible albuminurie, lorsque les urines sont

faiblement concentrées ou acides (Grauer, 2011). Aussi, des réactions faussement positives sont fréquentes lorsque le pH urinaire est basique – supérieur à 7,5 – ou lorsque les urines sont très concentrées (Grauer, 2011 ; Lees et al., 2005). Globalement, la protéinurie est détectée par la bandelette urinaire à partir de 30 mg/dL (Grauer, 2011). La plage réactive est également plus à même de se positiver en cas d'albuminurie. Les recommandations de l'ACVIM établies en 2005 préconisent de confirmer une réaction positive par un test de précipitation à l'acide sulfosalicylique ou une analyse quantitative de la protéinurie.

L'utilisation de l'électrophorèse des protéines urinaires afin de mettre en évidence une protéinurie a été étudiée et semble possible uniquement par l'utilisation de gel SDS-PAGE. En effet, une bonne corrélation entre la détection par électrophorèse SDS-PAGE et le RPCU a été obtenue lors d'une étude menée sur 51 chiens (Jaturakan et al., 2013). En revanche, une étude réalisée sur 87 spécimens montre qu'un tiers des animaux classés comme non protéinuriques par lecture d'une électrophorèse de haute résolution (HRE) sont en réalité protéinuriques. La même étude montre que plus d'un cinquième des animaux classés comme protéinuriques à la lecture d'une électrophorèse de type SDS-PAGE sont en réalité non protéinuriques (Giori et al., 2011). De même, une étude a comparé la pertinence de l'électrophorèse sur gel d'agarose pour détecter l'albuminurie à celle d'un test immunoturbidimétrique validé ; la concordance des résultats était de 86% ne permettant pas d'accepter l'électrophorèse comme détecteur d'albuminurie (Murgier et al., 2009). Finalement, la technique du SDS-PAGE étant peu accessible et relativement coûteuse, il ne semble pas judicieux de la réaliser dans un contexte de recherche de protéinurie.

b) Méthodes quantitatives

Le rapport des protéines et de la créatinine urinaires (RPCU) permet d'objectiver une protéinurie et son importance. Ce rapport reflète l'excrétion de protéines dans les urines des 24 dernières heures (Grauer, 2011 ; Lees et al., 2005). La limite à partir de laquelle on parle de protéinurie correspond à un RPCU de 0,2. Les chiens ayant un RPCU compris entre 0,2 et 0,5 sont depuis considérés comme douteux ou *limite protéinuriques*. Les animaux pour lequel le RPCU est inférieur à 0,2 sont considérés comme non protéinuriques (Grauer, 2011).

Par ailleurs, lorsque la protéinurie est rénale pathologique – glomérulaire ou tubulaire, le RPCU peut donner une indication sur la localisation des lésions. Un RPCU supérieur à 2,0 est très en faveur d'une atteinte glomérulaire (Grauer, 2011 ; Lees et al., 2005). En effet, les

tubulopathies sont quasi toujours à l'origine d'une protéinurie modérée ; en revanche les glomérulopathies peuvent induire des protéinuries d'intensité très variable (Lees et al., 2005). Le RPCU permet également de suivre l'évolution de la protéinurie mais une modification de 35% est nécessaire en cas de RPCU élevé (*i.e.* aux alentours de 12) et de 80% lors de RPCU proche de la valeur de 0,5 pour que l'évolution soit jugée significative (Nabity et al., 2007).

3. Origine de la protéinurie

Après exclusion des causes pré-rénales et post-rénales de la protéinurie et après vérification de la persistance de celle-ci, il convient d'en identifier le type.

a) Histologie

L'examen histologique de biopsies rénale est actuellement la méthode de référence pour localiser et définir l'atteinte rénale à l'origine de la protéinurie. Elle peut être réalisée à partir de biopsies du cortex rénal obtenues par laparoscopie ou plus couramment par ponctions au trucut échoguidées et doit idéalement être soumise à la lecture d'un pathologiste spécialiste par microscopie optique, microscopie électronique et immunofluorescence (Lees et al., 2011 ; IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup et al., 2013).

L'analyse histologique permet de révéler la nature des lésions à l'origine de la protéinurie mais aussi les mécanismes de mise en place de ces lésions, leur sévérité, chronicité et potentielle réversibilité (Lees et al., 2011). Effectivement, une composante immunitaire des lésions glomérulaires est présente chez environ 50% des sujets – c'est-à-dire que des lésions avec présence de complexes immuns sont mis en évidence à l'analyse histologique de leurs biopsies rénales. L'histologie permet alors de déterminer l'utilité de la mise en place d'un traitement immunomodulateur dans le cas d'une atteinte glomérulaire (Vaden and Elliott, 2016). Finalement, la réalisation de biopsies rénales est indiquée dans le cas d'une forte suspicion de glomérulopathie afin d'affiner le diagnostic, le pronostic et donc le traitement approprié (Lees et al., 2011, Vaden and Elliott, 2016).

Néanmoins la procédure d'obtention des biopsies est invasive et de nombreux chiens ne sont pas de bons candidats à sa réalisation. Notamment, elle ne doit pas être réalisée en cas de coagulopathie ou anémie sévère, d'hypertension non contrôlée, de maladie rénale chronique de stade IRIS 4, de pyélonéphrite, de kyste rénal ou d'hydronéphrose. Elle est également déconseillée chez les animaux de poids inférieur à 5kg (Lees et al., 2011 ; Vaden and Elliott,

2016).

Vaden et Elliott proposent de considérer la réalisation de biopsies rénales chez les animaux présentant une protéinurie évocatrice d'une glomérulopathie ne présentant pas de contre-indications à la biopsie et étant réfractaires au traitement initial. Ils envisagent de mettre en place un traitement immunomodulateur chez les animaux présentant une protéinurie glomérulaire à condition qu'ils ne présentent pas de contre-indication à l'utilisation de ces thérapies, qu'ils ne soient pas prédisposés (âge et race) aux néphropathies familiales que la créatininémie soit stable et inférieure à 3 mg/dL, que l'albumine soit supérieure à 2 g/dL et que l'hypothèse de l'amyloïdose est écartée (2016).

Le consensus IRIS de 2013 recommande de réaliser des biopsies rénales lors d'une protéinurie forte (RPCU $\geq 3,5$) ne répondant pas au traitement ou en progression malgré l'instauration d'un traitement et/ou lorsqu'une thérapie immunosuppressive est initiée ou envisagée et que la maladie rénale chronique n'est pas en stade terminal – correspondant au stade IRIS IV (IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup et al., 2013).

b) Marqueurs biologiques urinaires

Récemment, plusieurs marqueurs biologiques urinaires ont été étudiés pour mettre en évidence des néphropathies de manière plus précoce que la créatinine – qui n'augmente significativement qu'une fois 75% du tissu rénal endommagé. Ils sont usuellement évalués sous forme de rapport entre les marqueurs urinaires et la créatinine urinaire afin de se prévaloir des variations quotidiennes (Smets et al., 2010 ; Lavoué et al., 2015) et de la dilution fluctuante des urines.

Plusieurs marqueurs d'atteinte glomérulaire ont été étudiés, il s'agit de protéines de haute masse moléculaire ne passant pas la barrière glomérulaire chez le chien sain. Notamment, les concentrations rapportées à la créatinine urinaire des immunoglobulines G et M sont significativement associées à des cas de glomérulonéphrite par dépôt d'immun complexes. Néanmoins ce ne sont pas des marqueurs spécifiques de glomérulopathie, puisque les rapports sont corrélés à des lésions histologiques glomérulaire et tubulo-interstitielles (Cianciolo et al., 2016).

Plusieurs marqueurs d'atteinte tubulaire ont également été étudiés. La protéine de liaison au rétinol (RBP) est une protéine de faible masse moléculaire réabsorbée dans le tubule

proximal du rein chez le chien sain. Elle serait significativement associée avec des lésions histologiques tubulaires mais aussi avec des lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles. Elle est augmentée en cas de maladie rénale chronique et les études ne tendent pas toutes vers les mêmes conclusions quant à son utilité dans la localisation de l'atteinte (Lavoué et al., 2015 ; Cianciolo et al., 2016). La N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) est une enzyme des cellules épithéliales des tubules rénaux relarguée lors d'altération de ces cellules. Mais les études tendent à montrer qu'elle n'est pas spécifique de l'altération tubulaire, voire qu'elle serait plus caractéristique d'une altération de la fonction glomérulaire sans qu'aucun mécanisme précis ne soit arrêté à l'heure actuelle (Cianciolo et al., 2016, Hokamp et al., 2016).

Finalement, les marqueurs urinaires précités seraient utiles pour détecter une maladie rénale précoce mais les études manquent afin de valider leur utilisation dans la localisation de l'altération rénale. De plus, leur accessibilité en médecine vétérinaire est très limitée. Il existe des kits rapides ELISA vétérinaires pour doser l'albumine et les immunoglobulines urinaires, un kit rapide ELISA humain pour doser la RBP, préalablement validé pour son utilisation en médecine vétérinaire (Maddens et al., 2010) et un test colorimétrique pour doser la NAG. Néanmoins ces tests sont très onéreux et peu répandus, justifiant la limitation de leur utilisation à la recherche clinique uniquement à l'heure actuelle.

c) Electrophorèse des protéines urinaires

L'électrophorèse des protéines urinaires permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. La mise en évidence de bandes de haute masse moléculaire (> 68 kDa) est évocatrice d'une protéinurie d'origine glomérulaire et la mise en évidence de bandes de faible masse moléculaire est évocatrice d'une protéinurie d'origine tubulaire.

Une étude préliminaire réalisée par Schultze et Jensen en 1989 sur 18 chiens étudie la pertinence diagnostique de l'électrophorèse sur SDS-PAGE afin de localiser l'origine de la protéinurie. Parmi les 18 chiens de l'étude, 6 sont non protéinuriques et ne présentent pas d'anomalie à l'analyse urinaire et 12 présentent une protéinurie (>30 mg/dL) sans culot urinaire associé. Des analyses histologiques rénales sont disponibles chez 8 des 12 chiens protéinuriques et concordent chez 7 chiens sur 8. Par ailleurs, les auteurs émettent un doute quant à la représentativité des échantillons de biopsie rénale recueilli chez le chien pour lequel l'histologie ne correspond pas à l'électrophorèse, estimant que les résultats de cette dernière sont plus en accord avec les données anamnestiques. Finalement, cette étude suggère que l'électrophorèse

serait un bon moyen d'identification de l'origine d'une protéinurie rénale. Dans cette même étude, l'étude des profils électrophorétiques des chiens sains révèle la présence de trois bandes plus ou moins marquées entre 65 et 100 kDa chez chacun d'eux. De plus, d'autres bandes sont visibles chez deux d'entre eux à savoir respectivement des bandes de haute masse moléculaire et des bandes de toute masse moléculaire. Les auteurs émettent l'hypothèse que la modification du profil électrophorétique urinaire sur SDS-PAGE est un marqueur de dysfonctionnement rénal, plus précoce que la protéinurie elle-même. Néanmoins, il ne peut être exclu que cette observation soit la traduction d'une mauvaise valeur prédictive positive du test.

En 2004, une étude rétrospective portant sur 49 chiens menée par Zini et son équipe tente d'évaluer la corrélation entre profil électrophorétique SDS-PAGE et lésions histopathologiques rénales. Les urines sont prélevées par cystocentèse et conservées moins de 7 jours entre 4 et 8°C. Une sensibilité de 100% et une spécificité de 40% sont rapportées concernant la détection des glomérulopathies et de 92,6% et 62,5% concernant la détection de tubulopathies. La faible spécificité semble pouvoir être expliquée en partie par l'inclusion des profils ne présentant qu'une seule bande d'albumine comme glomérulopathes. Effectivement, la présence d'albumine dans les urines est physiologique à hauteur de 1 mg/dL, la présence d'une bande d'albumine faiblement marquée est donc considérée comme physiologique par certains auteurs (Grauer, 2011 ; Lavoué et al., 2015). Par ailleurs, aucune corrélation entre le type de glomérulopathie et la répartition des bandes de haute masse moléculaire n'a pu être effectuée. Aussi, la détection de bandes de 12 et 15 kDa était pathognomonique d'une tubulopathie de score histologique 3 ou 4.

En 2010, une étude menée sur 70 chiens néphropathes par Brown et son équipe compare également l'électrophorèse des protéines urinaires sur SDS-PAGE aux résultats d'histologie sur biopsies rénales. Aucune donnée quant à l'obtention ou la conservation des urines n'est disponible. Les auteurs relatent une sensibilité de 97% et une spécificité de 60% concernant la détection des glomérulopathies (protéines de masse moléculaire > 70 kDa) et de 82% et 50% concernant la détections des tubulopathies (protéines de masse moléculaire < 40 kDa). Aussi, ils ont pu corrélérer le type de profil électrophorétique à la sévérité des dommages tubulaires ou glomérulaires gradés par histologie avec une corrélation plus importante pour les glomérulopathies que pour les tubulopathies. Néanmoins l'étude n'ayant fait l'objet que d'une communication orale et pas de publication écrite, aucune information complémentaire n'est disponible.

Conjointement, ces études tendent à démontrer une bonne sensibilité et d'une spécificité variable des profils électrophorétiques pour la localisation des lésions rénales. Néanmoins le protocole de récolte et conservation des urines varie d'une étude à l'autre et, si le principe général de distinction de l'origine des protéines en fonction de leur masse moléculaire est acquis, la limite entre haute et basse masse moléculaire et l'interprétation d'une bande d'albumine varie en fonction des auteurs.

C. Données actuelles concernant l'électrophorèse des protéines urinaires chez le chien

1. Emploi de l'électrophorèse des protéines urinaires en médecine vétérinaire

a) Affections rénales

L'électrophorèse des protéines urinaires est aujourd'hui utilisée pour caractériser une protéinurie rénale, mais aussi pour suivre l'évolution des lésions, notamment lors de maladies congénitales. Elle permet de distinguer une tubulopathie d'une glomérulopathie avec une très bonne sensibilité mais une spécificité variable selon les études (Brown et al., 2010 ; Schultze and Jensen, 1989 ; Zini et al., 2004).

b) Utilisation de l'électrophorèse des protéines urinaires en recherche clinique

La validation de l'utilisation de l'électrophorèse afin de déterminer l'origine de la protéinurie rénale permet l'étude de la protéinurie dans les affections canines à plus grande échelle. Effectivement, il semble peu éthique de soumettre des individus à des biopsies rénales afin d'étudier les co-affections ou l'impact d'une affection sur la fonction rénale, en revanche, il est tout à fait légitime d'utiliser un prélèvement d'urine – déjà réalisé à fins cliniques – pour l'intégrer à des protocoles de recherche puisque celui-ci ne soumet pas l'animal à des procédures supplémentaires cliniquement non justifiées.

Ainsi, l'impact de la formation d'immuns complexes sur le rein a été étudié chez 15 chiennes atteintes de pyomètre, confirmant l'atteinte glomérulaire associée à l'excrétion

urinaire d'immunoglobulines G et A notamment (Zaragoza et al., 2004). Les conséquences de la formation d'immuns complexes dans le cas d'infestation par *Dirofilaria immitis* ont également été explorées par SDS-PAGE chez 15 chiens atteints et 15 chiens sains permettant de confirmer une atteinte mixte à dominante glomérulaire (Beristain-Ruiz et al., 2013). D'autres études se sont intéressées à des atteintes systémiques à conséquences rénales diverses. Une étude menée sur 39 chiens présentant un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) et 15 chiens sains a permis de mettre en évidence une protéinurie rénale mixte chez les individus non sains, laissant suspecter que le SRIS a des conséquences rénales (Schaefer et al., 2011). Aussi, une étude a pu déterminer l'impact de l'hyperadrénocorticisme sur la réabsorption tubulaire en mettant en évidence des protéines de faible masse moléculaire sur les électrophorèses des protéines urinaires sur gel d'agarose chez 9 chiens souffrant d'hyperadrénocorticisme hypophysaire. La même étude montre qu'aucune rémission n'est observée suite au traitement à base de trilostane. L'électrophorèse a été très utile dans ce cas où les précédentes études ne s'accordaient pas sur le mécanisme de la protéinurie et où l'hypothèse principale était celle d'une perméabilité glomérulaire secondaire à l'hypertension (Caragelasco et al., 2017).

c) Myélome multiple

L'électrophorèse des protéines urinaires est recommandée lors de myélome multiple afin de rechercher une protéinurie de Bence Jones – tant pour le diagnostic que pour monitorer l'évolution de la maladie et ses complications (Vail, 2012 ; Le Bricon et al., 1998). En association avec l'électrophorèse des protéines sériques et en confrontation avec les analyses radiographiques et histologiques, elle permet de déterminer le caractère sécrétant ou non du myélome multiple. Peu d'informations sont disponibles quant à l'utilisation de l'électrophorèse des protéines urinaires à cet effet en pratique vétérinaire. Le myélome multiple non sécrétant est une forme rare de cette tumeur caractérisée par l'absence de sécrétion monoclonale d'immunoglobuline et donc l'absence de pic d'immunoglobine monoclonale sur les profils électrophorétiques sériques ou urinaires. Un cas de myélome multiple non sécrétant chez une Chihuahua de 12 ans est rapporté, malheureusement les techniques électrophorétiques utilisées ne sont pas précisées et il est donc difficile de définir si les pics monoclonaux étaient réellement absents ou si les techniques employées n'ont pas permis leur détection (Marks et al., 1995).

En médecine humaine, une étude menée sur 47 individus atteints de myélome multiple a permis de valider l'utilisation de l'électrophorèse SDS-AGE afin de mettre en évidence une

protéinurie de Bence Jones avec une sensibilité de 97%. L'avantage de cette technique est la possibilité d'analyser la protéinurie pré-rénale – protéinurie monoclonale de Bence Jones caractéristique de l'affection – et la protéinurie rénale – protéinurie polyclonale due aux lésions rénales secondaires à l'affection. Le principal inconvénient est la difficulté de distinction entre protéinurie monoclonale ou polyclonale ; en l'absence de protéinurie d'origine rénale, une bande à 25 kDa est caractéristique d'une protéinurie de Bence Jones mais lorsque des lésions tubulaires conduisent à la présence de protéines de faible masse moléculaire dans les urines, l'interprétation de l'électrophorèse est plus complexe (Le Bricon et al., 1998). L'auteur n'a pas connaissance d'une étude similaire en médecine vétérinaire.

d) Infection du tractus urinaire et maladie rénale chronique

Une étude s'est intéressée à l'utilité de l'électrophorèse afin de distinguer une protéinurie d'origine rénale et post-rénale. Pour ce faire, des électrophorèses des protéines urinaires de chiens atteints de maladie rénale chronique (MRC) de stade IRIS II à IV ont été comparées à celles de chiens atteints d'infection du tractus urinaire (ITU). Finalement, la protéinurie est globalement mais non significativement plus forte en cas de MRC qu'en cas d'ITU mais aucune différence notable n'a été relevée à la lecture des profils, il semble donc que l'électrophorèse ne puisse être utilisée dans ce cas (Jaturakan et al., 2013).

2. Influence des facteurs pré-analytiques et analytiques sur l'électrophorèse des protéines urinaires

a) Influence de la durée et de la température de conservation

A la connaissance de l'auteur, il n'existe qu'une publication concernant l'influence des conditions de conservation (temps et durée) des échantillons d'urine sur le profil électrophorétique des protéines urinaires du chien.

Cette étude prospective a été menée par Théron et son équipe en 2017 sur 20 chiens protéinuriques et 20 chiens non protéinuriques. Sur chaque chien, un échantillon d'urine a été prélevé par cystocentèse échoguidée ou miction naturelle en fonction des cas puis centrifugé et séparé en différents tubes de 500 μ L permettant chaque fois la réalisation d'une électrophorèse SDS-AGE et le calcul du RPCU. Les échantillons de 500 μ L étaient stockés et analysés comme suit :

- Un premier échantillon pour analyses immédiates
- Trois échantillons conservés à température ambiante (20°C) pour analyses respectivement 1, 2 et 5 jours après collecte
- Trois échantillons conservés à 4°C pour analyses respectivement 1, 2 et 5 jours après collecte
- Quatre échantillons conservés à -20°C pour analyses respectivement 30, 60, 90 et 360 jours après collecte
- Quatre échantillons conservés à -80°C pour analyses respectivement 30, 60, 90 et 360 jours après collecte

Deux échantillons de 1mL étaient également disponibles pour chaque prélèvement et ont donc été conservés respectivement à -20°C et -80°C en vue d'analyser l'influence des décongélation-recongélation répétitives. Ils ont été décongelés et analysés 15 jours après collecte puis recongelés et l'expérience a été répétée à l'identique 90 et 260 jours après collecte.

Finalement, les profils de 39 des 40 chiens étaient identiques après conservation à température ambiante, 4°C ou -80°C et après décongélation-recongélation. Chez un chien de l'étude, une bande discrète de protéine de haute masse moléculaire était visible sur le profil électrophorétique du spécimen conservé 360 jours à -80°C et pas sur les autres profils. En revanche, les échantillons conservés à -20°C aboutissaient à des profils modifiés avec l'apparition d'une ou plusieurs bandes de masse moléculaire supérieur à 150 kDa et/ou l'intensification d'une bande de 150 kDa dès 15 jours dans 78% des cas (31 chiens). Conjointement à ces modifications des bandes de haute masse moléculaire, une diminution d'intensité voire une disparition des bandes de faible masse moléculaire ou de l'albumine a été observée chez 9 de ces 31 chiens. En conséquence, les auteurs déconseillent la conservation des urines à -20°C en vue de réaliser une électrophorèse de protéines urinaires mais recommandent de les conserver à température ambiante ou à 4°C pour une analyse sous 5 jours et à -80°C pour une conservation plus longue – jusqu'à 360 jours.

Bien que cette étude soit la seule de la sorte en médecine vétérinaire, elle est étayée par deux études réalisées sur des urines humaines. Une première étude réalisée sur les urines d'un individu n'a pas montré d'altération du profil SDS-PAGE après que les urines aient été conservées jusqu'à 24h à température ambiante ou après qu'elles aient été décongelées-recongelées jusqu'à 5 fois à -80°C (Lee et al., 2008). Une seconde étude réalisée sur 40 individus a montré une altération du profil électrophorétique des protéines urinaires dans 27,5%

des cas lorsque les échantillons étaient conservés à -20°C pendant 12 mois alors qu'aucune modification n'a été détectée lorsqu'ils étaient conservés à -70°C durant la même période (Kania et al., 2010).

b) Influence du mode de prélèvement

A la connaissance de l'auteur, il n'existe pas d'étude concernant l'influence du mode de prélèvement des urines sur le profil électrophorétique des protéines urinaires du chien. En médecine humaine, il est recommandé de réaliser l'électrophorèse des protéines urinaires sur des urines recueillies sur 24h mais c'est une contrainte qui mène à de nombreuses erreurs d'échantillonnage. Une étude a comparé les profils électrophorétiques des protéines urinaires de 40 individus présentant une protéinurie glomérulaire en fonction de leur mode de prélèvement. Aucune modification visuelle ou densitométrique des profils SDS-PAGE n'a été détectée entre les urines de 24 heures et les premières urines du matin (Bottini et al., 2002).

Compte-tenu de leur mode de vie, il n'est pas réalisable de récolter les urines des chiens sur 24 heures consécutives en pratique courante. Habituellement, les urines sont prélevées par cystocentèse afin de se prévaloir des bactéries et impuretés naturellement présentes dans les voies basses du tractus urinaire, pouvant être source de protéinurie non rénale. Néanmoins cela nécessite une visite chez le vétérinaire et représente un acte plus invasif que le prélèvement d'urines à domicile par le propriétaire. Si aucune étude sur l'influence du mode de prélèvement des urines sur le profil électrophorétique des protéines urinaires du chien n'est actuellement disponible, plusieurs études comparent l'influence du mode de prélèvement des urines sur le RPCU. Nous en retiendrons trois réalisées respectivement sur 81 chiens (Beatrice et al., 2010), 59 chiens (Diemer, 2017) et 43 chats (Vilhena et al., 2015). Toutes concluent que si après examen du sédiment urinaire, les spécimens présentant des signes évocateurs d'une infection du tractus urinaire, une spermaturie ou une hématurie macroscopique sont exclus de l'étude, le RPCU ne dépend pas significativement du mode de prélèvement. Les modes de prélèvement incluent cystocentèse et miction naturelle avec récupération d'urines de milieu de miction dans deux études (Beatrice et al., 2010 ; Vilhena et al., 2015) et cystocentèse et miction naturelle avec et sans nettoyage préalable de la zone génitale dans l'étude de Diemer (2017).

On pourrait penser que si le RPCU est stable en fonction du mode de prélèvement, il en sera de même pour le profil électrophorétique des protéines urinaires. Néanmoins, l'analyse comparée des publications concernant la stabilité du RPCU et des profils électrophorétiques

des protéines urinaires en fonction de la conservation des échantillons d'urine démontre qu'il n'influe pas exactement de la même façon sur ces deux variables (Rossi et al., 2012 ; Théron et al., 2017). Aussi, on ne peut pas exclure qu'une protéine excrétée en faible quantité soit visible sur le profil électrophorétique sans qu'elle ne fasse varier le RPCU. Les résultats de l'influence du mode de collecte des urines sur le RPCU testent donc à vérifier sur le profil électrophorétique des protéines urinaires.

c) Influence du sexe de l'animal

Plusieurs études ont montré de manière fortuite que les chiens mâles peuvent excréter une protéine de 25 à 30 kDa, traduite par une bande visible sur les profils électrophorétiques des protéines urinaires. Cette bande a été observée de manière intermittente chez les six chiens mâles entiers d'une étude menée par Schellenberg et son équipe, qui l'ont identifiée par spectrométrie de masse comme correspondant à l'arginine estérase canine, protéine sécrétée par la prostate (2011). Par ailleurs, cette bande a été retrouvée chez 25 des 30 mâles de l'étude de Lavoué (2015) et chez 10 des 11 mâles de l'étude de Théron (2017).

En 2013, une étude préliminaire a comparé les électrophorèses des protéines urinaires de 4 groupes d'animaux non protéinuriques, regroupant respectivement 5 femelles entières, 5 femelles stérilisées, 5 mâles entiers et 5 mâles castrés. Une bande de faible intensité et de faible masse moléculaire était présente sur les profils de 4 des 5 chiens entiers (Piane et al., 2013). En 2016, une seconde étude réalisée sur 65 chiens mâles entiers sains et 12 mâles castrés sains a mis en évidence la présence d'une bande de 25 à 30 kDa chez 95% des mâles entiers de l'étude et aucun des mâles castrés. Par ailleurs, il a été montré que cette bande persistait jusqu'à 15 jours après castration des mâles entiers (Groue, 2016).

Finalement, la convergence de ces études démontre qu'une bande de 25 à 30 kDa peut être présente de manière physiologique sur le profil électrophorétique des protéines urinaires d'un chien mâle entier ou castré depuis moins de 15 jours.

d) Influence du moment de lecture du gel

Il est connu que les bandes visibles sur les gels d'électrophorèse, bien que fixées, ne sont pas stables dans le temps et ont tendance à progressivement s'effacer. Le processus serait ralenti si les gels sont stockés dans le noir et en théorie, les gels effacés peuvent être restaurés par re-fixation (Chrambach et al., 1967). Dans une étude, l'effacement des bandes de faible

intensité après 360 jours de stockage à température ambiante et dans le noir a été constaté (Théron et al., 2017). Cependant, l'auteur n'a pas connaissance de recommandations quant au moment idéal de lecture des profils électrophorétiques ou d'étude dédiée à l'analyse de la stabilité des gels fixés. La notice d'utilisation de l'Hydragel 5 Protéinuria® (Sebia Italia SRL, Bagno a Ripoli, Firenze Italy) ne mentionne pas non plus de telles recommandations. Il semble judicieux d'analyser les gels le plus rapidement possible après fixation compte-tenu de l'effacement constaté de manière empirique.

e) Influence du stress du sujet

Le stress est un des facteurs connus comme pouvant induire une protéinurie fonctionnelle (Grauer, 2009). Or les prélèvements d'urine sont réalisés exclusivement en milieu vétérinaire, où les animaux sont particulièrement soumis au stress. Une étude menée sur 24 chiens s'est intéressée à la différence du RPCU selon que les urines aient été prélevées au domicile du chien ou chez le vétérinaire. Dans cette étude le RPCU est modifié en fonction du lieu de prélèvement chez 62% des animaux ; il est significativement augmenté lorsque les urines sont prélevées à l'hôpital par rapport à un prélèvement à domicile par le propriétaire (Duffy et al., 2015). Les mécanismes impliqués dans la protéinurie de stress sont peu connus ; des phénomènes de vasoconstriction rénale, ischémie et congestion sont évoqués mais non démontrés (Grauer, 2009). Finalement, on peut se demander si le RPCU est augmenté de manière uniforme ou si des protéines spécifiques sont sécrétées en situation de stress. Aucune étude de l'influence du stress sur le profil électrophorétique des chiens n'est disponible à la connaissance des auteurs mais une étude humaine existe. Celle-ci compare la protéinurie et les profils électrophorétiques de membres de la famille proche de personnes en phases terminales de cancer dont le seuil élevé de stress a été confirmé par un test psychologique à ceux de sujets non soumis au stress. Il en résulte que le RPCU des personnes en situation de stress est significativement plus élevé et leurs profils électrophorétiques montrent une protéinurie mixte, sans que des bandes spécifiques aient été retenues comme protéines du stress. Il s'agit d'une étude préliminaire qui nécessite d'être complétée par une étude menée sur une cohorte plus importante (Ratnakar et al., 2008).

f) Influence de l'heure du prélèvement

Aucune étude ne s'intéresse aux modifications du profil électrophorétique en fonction de l'heure de prélèvement des urines. Une étude a montré que l'heure du prélèvement

n'impactait pas le RCPU chez le chien (McCaw et al., 1985). Une seconde étude a démontré que le RCPU variait quotidiennement et qu'il est préférable de récolter les urines sur plusieurs jours (un échantillon par jour) afin d'avoir un RCPU plus représentatif (Nabity et al., 2007). Enfin, il a été prouvé que déterminer le RCPU à partir d'un mélange de trois échantillons d'urine récoltés trois jours différents était corrélé à la moyenne des mesures séparées de ces trois échantillons (LeVine et al., 2010). Finalement lorsqu'une mesure isolée de RCPU est anormale, il est recommandé de répéter la mesure en utilisant des urines récoltées plusieurs jours consécutifs. Ceci est d'autant plus important que la mesure initiale est élevée (IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup et al., 2013). Néanmoins, les modifications quotidiennes du RCPU ne permettent pas d'hypothétiser que le profil électrophorétique des protéines urinaires change d'un jour à l'autre, les modifications du RCPU étant plus probablement dues aux variations du débit de filtration glomérulaire (DFG) qu'aux mécanismes de mise en place de la protéinurie. On ne peut pas exclure pour autant que des modifications du DFG puisse être à l'origine de variation du profil ; une étude prospective évaluant les variations quotidiennes du profil électrophorétique des protéines urinaires chez le chien est donc nécessaire afin de déduire des recommandations.

En médecine humaine, une étude des profils électrophorétiques de 20 individus excréant des protéines de Bence Jones (protéinurie pré-rénale) réalisés sur des urines récoltées à différents moments de la journée est disponible – il était demandé aux sujets de recueillir chacune de leurs émissions d'urine de façon individuelle pendant 24 heures. Trois des individus présentaient au moins un échantillon d'urines ne permettant pas la détection de bandes de faible masse moléculaire à l'électrophorèse alors qu'elles étaient visibles sur le profil des premières urines du matin, supportant la théorie qu'il est préférable d'utiliser les premières urines du matin afin de réaliser une électrophorèse des protéines urinaires (Brigden et al., 1990). Ces données seraient en contradiction avec une étude plus ancienne menée par Hobbs en 1975, jugeant qu'aucune différence du profil électrophorétique n'est décelable en fonction du moment du prélèvement, malheureusement l'auteur n'a pas réussi à se procurer de copie de cette étude.

g) Influence de la concentration des urines

Si les techniques électrophorétiques actuelles permettent la migration des protéines sans concentration préalable des urines, il est parfois nécessaire de diluer celles-ci, notamment lorsque la concentration en protéines dépasse 2 g/L (Le Bricon et al., 1998). Toutefois, il est

recommandé de concentrer les urines à 10g/L de protéines lors de la recherche de protéines de Bence Jones par HRE (Levison SS, 2000).

L'auteur n'a pas connaissance d'étude vétérinaire ou humaine traitant de l'influence de la concentration des protéines sur le profil électrophorétique (SDS-AGE, SDS-PAGE ou HRE). Néanmoins, la densité urinaire semble avoir un impact sur le profil électrophorétique. En effet, plus les urines sont concentrées, plus le risque de détecter une protéinurie tant par SDS-AGE que par HRE est important (Giori et al., 2011). Une étude dédiée à cet impact est nécessaire afin de préciser les recommandations actuelles des fabricants.

SECONDE PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE

A. Contexte et objectifs

L'analyse complète des urines, notamment la protéinurie, présente un intérêt diagnostique et pronostique dans de nombreuses affections. Dans le contexte des maladies rénales chroniques elle peut être décisive pour la mise en place d'un traitement, l'évaluation de la réponse à ce dernier et le suivi de la progression de la maladie (Jacob et al., 2005 ; IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup et al., 2013).

La protéinurie peut avoir une origine pré-rénale, rénale ou post rénale. Afin d'en connaître l'origine, une démarche rigoureuse est recommandée : élimination des causes post-rénales extra-urinaires (cystocentèse), élimination des causes pré-rénales (évaluation de la protéinémie), recherche des causes rénales et urinaires (analyse d'urine complète, examens d'imagerie). Les atteintes conduisant à une protéinurie rénale peuvent être glomérulaires, tubulaires ou interstitielles (Lees et al., 2005). Les causes et conséquences de chacune de ces atteintes étant différentes, il est recommandé de chercher le type de protéinurie lorsque celle-ci est rénale. Si la valeur du RPCU peut provoquer l'intuition, seule l'analyse histologique de biopsies rénales permet de définir l'atteinte avec certitude (Grauer, 2011 ; Lees et al., 2005). Or, l'obtention des biopsies représente un acte invasif, sur des animaux parfois débilisés, c'est pourquoi elles sont parfois déconseillées (Lees et al., 2011 ; IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup et al., 2013).

Pour des raisons variées, peu d'animaux présentant une protéinurie rénale ont un diagnostic définitif par biopsies en France. Dans ce contexte, de nouvelles méthodes de détermination du site lésionnel ont été pensées. Parmi celles-ci, l'électrophorèse des protéines urinaires est une méthode peu chère et non invasive permettant de séparer les protéines contenues dans les urines par migration différentielle. Elle est basée sur le principe que le type de protéines excrétées dans les urines varie en fonction du site lésionnel et permet de différencier les atteintes rénales avec une très forte sensibilité et une spécificité variable selon les études (Brown et al., 2010 ; Schultze and Jensen, 1989 ; Zini et al., 2004).

Une des explications proposées afin de justifier les variations de spécificité et de sensibilité en fonction des études est le manque de standardisation des facteurs pré-analytiques et analytiques. Notamment, aucune validation n'a été effectuée concernant le mode de prélèvement des urines, qui est parfois variable au sein d'une même étude. Dans cette étude,

nous cherchons donc à confirmer ou infirmer la nécessité de prélever les urines par cystocentèse afin de réaliser une électrophorèse de leurs protéines. Outre l'homogénéisation des critères pré-analytiques, dans le cas où l'hypothèse est infirmée cette étude permettrait aux propriétaires d'animaux présentant une protéinurie rénale de réaliser directement les prélèvements à domicile en s'épargnant donc le stress lié au trajet, le coût de la visite et le caractère invasif de la cystocentèse. Un bilan des recommandations pré-analytiques actuelles et manquantes est disponible TABLEAU 1.

TABLEAU 1 : Bilan des recommandations pré-analytiques pour la réalisation d'une électrophorèse des protéines urinaires chez le chien.

Facteurs pré-analytiques	Recommandations
Durée et température de conservation	- Température ambiante ou 4°C pendant 5 jours - -80°C jusque 360 jours
Mode de prélèvement	Absence de recommandations
Sexe de l'animal	Apparition d'une bande à 25-30 kDa chez les mâles entiers, de façon non systématique
Moment de lecture du gel	Absence de recommandations Constat : effacement des bandes après un an de conservation dans le noir à température ambiante.
Stress du sujet	Absence d'étude. Comme pour chaque analyse, un stress minimal est recommandé
Heure du prélèvement	Absence de recommandations
Concentration des urines	Dilution si protéinurie > 2g/L Constat : Plus de faux positifs dans les spécimens à densité élevée

B. Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) de Janvier 2016 à Juin 2016 après validation par le Comité d'Ethique en expérimentation animale sous le numéro d'enregistrement SSA 115.

1. Animaux

a) Critères d'inclusion

Les animaux sont inclus uniquement après complète information du propriétaire et signature du « Formulaire de consentement éclairé » (Annexe 1). Tout chien présenté en consultation à l'ENVT nécessitant la récolte d'urine par cystocentèse pour raison médicale ainsi que tout chien sain appartenant à un propriétaire désireux de participer à l'étude peut être inclus.

b) Critère d'exclusion

Aucun critère d'exclusion initiale n'a été retenu. Les critères d'exclusion au laboratoire incluent :

- Un des trois prélèvements d'un animal inférieur à 2 mL
- Contamination macroscopique des urines après prélèvement (par le chien ou par erreur de manipulation)
- Délai de récolte supérieur à 6h entre le premier et le dernier des trois prélèvements
- Pigmenturie secondaire au moins partiellement à une hématurie macroscopique (confirmée par mise en évidence de plus de 250 globules rouges par champs au grossissement x400) lors du premier prélèvement par miction spontanée. En cas de pigmenturie macroscopique (coloration rougeâtre des urines) non associée à la mise en évidence d'hématies à l'examen microscopique, les urines ne sont pas exclues de l'étude.

c) Préparation des chiens sélectionnés

Chaque animal inclus dans l'étude dispose d'une fiche d'accompagnement de prélèvements permettant la centralisation de ses informations cliniques et biologiques et une fiche d'analyse permettant la centralisation des données concernant l'analyse des urines sur

lequel n'est mentionné que son numéro d'étude afin de préserver l'anonymat. Ces deux documents sont visibles respectivement en Annexes 2 et 3.

Les chiens sont identifiés de la façon suivante : « CUPROT 1 à X » en fonction du numéro d'inclusion dans l'étude. Les animaux prélevés n'ayant pu être inclus gardent leur identification afin d'être répertoriés. Les individus sont classés en trois groupes selon leur gabarit, le gabarit étant le poids de forme estimé du chien prélevé :

- Gabarit 1 pour les chiens dont le poids de forme est estimé inférieur à 15kg
- Gabarit 2 pour les chiens entre 15 et 35kg
- Gabarit 3 pour les chiens dont le poids est supérieur à 35kg

d) Prélèvements urinaires

L'urine de chaque chien est prélevée par 3 techniques différentes, dans l'ordre suivant : miction spontanée simple, miction spontanée après nettoyage de la sphère uro-génitale et cystocentèse.

i. Miction spontanée simple

Les poils autour de la zone uro-génitale sont coupés à l'aide de ciseaux s'ils sont longs, afin d'éviter une contamination du prélèvement. L'urine est collectée à l'aide d'une barquette Caissipack® propre et exempte de tout poil, poussière ou produit nettoyant risquant de biaiser l'analyse d'urine. La collecte se fait en limitant le contact avec les poils de la zone uro-génitale. Si une contamination majeure du spécimen a lieu, celui-ci est jeté.

ii. Miction spontanée après nettoyage de la sphère uro-génitale

Pour les femelles, la vulve est nettoyée à l'aide de compresses imbibées d'eau tiède non stérile. Pour les mâles, le fourreau est rincé à l'aide d'une seringue de 20mL remplie d'eau tiède non stérile. Le rinçage est effectué jusqu'à ce que l'eau ressortant du fourreau soit macroscopiquement propre. L'extrémité du fourreau est nettoyée à l'aide de compresses imbibées d'eau tiède non stérile. L'urine est collectée de la même façon que décrite pour la miction spontanée simple.

iii. Cystocentèse écho-guidée

Le chien est placé en décubitus dorsal dans un coussin de contention. La peau de la zone de prélèvement est nettoyée à l'aide de gluconate de Chlorhexidine (Hibitane 5%®). Cette

solution permet également de créer une fenêtre acoustique. La vessie est visualisée par échographie dans son grand axe en coupe longitudinale. L'image choisie afin de guider la cystocentèse est celle permettant d'obtenir la plus grande surface sur l'écran. Une aiguille de 23 gauge (23G, BD Microlance™ 3 – Becton Dickinson S.A.) montée sur une seringue stérile de 10 mL (Terumo®) est introduite dans la vessie crânialement à la sonde échographique, de façon à être simultanément visualisée sur l'écran de l'échographe. L'urine est ensuite prélevée à l'aide de la seringue.

Pour chacun des prélèvements, un volume minimal de 2mL d'urine est collecté, soit 6mL par chien au minimum.

2. Etapes pré-analytiques

a) Préparation des urines

Dans la période immédiate suivant leur collecte, les urines sont transférées dans des tubes à fond conique Eppendorf classiques® préalablement identifiés comme suit :

- Pour les prélèvements par miction naturelle simple : numéro d'étude (CUPROT 1 à CUPROT X) suivi de la mention MAS. Exemple : « CUPROT 1 à X, MAS »
- Pour les prélèvements par miction naturelle avec nettoyage de la zone uro-génitale : numéro d'étude (CUPROT 1 à CUPROT X) suivi de la mention MAN. Exemple : « CUPROT 1 à X, MAN »
- Pour les prélèvements par cystocentèse : numéro d'étude (CUPROT 1 à CUPROT X) suivi de CYS. Exemple : « CUPROT 1 à X, CYS »

Les tubes sont ensuite portés au Laboratoire Central de l'ENVT accompagné du consentement éclairé et des fiches de prélèvement et d'analyse (ANNEXES 1 à 3).

b) Délai entre collecte et analyse du culot au Laboratoire Central

Un délai maximal de 2h est respecté entre collecte et préparation des spécimens (Delanghe and Speeckaert, 2014).

c) Centrifugation

Les tubes à fond conique remplis d'urine sont centrifugés dans la centrifugeuse ROTOFIX 32A (Andreas Hettich GmbH and Co. KG D- 78532 Tuttlingen) à 1500 tours/min (RCF=250g) pendant 5 minutes (rayon de centrifugation = 10.00 cm ; 13.5 – 3.5 ; référence des godets : 1741) (Delanghe and Speeckaert, 2014). Le surnageant est utilisé pour préparer les spécimens liquides.

d) Aliquotage et préparation des spécimens liquides

L'extraction du surnageant se fait à l'aide d'une pipette à usage unique appelée « pastette » (Pipette pasteur plastique pointe fine, Copan, Brescia, Italia). Un volume de 0,5 mL du surnageant est conservé pour la réalisation des analyses analytiques immédiates (densité urinaire, bandelette urinaire et analyse du sédiment).

Le surnageant restant est réparti dans six tubes Eppendorf classique® préalablement identifié « CUPROT 1 à X » suivis de la mention « MAS, MAN ou CYS » selon la méthode de prélèvement et « -80, E » pour les tubes destinés à la réalisation d'une électrophorèse ou « -80, R » pour les tubes destinés à la réalisation du RPCU. Les tubes sont ensuite conservés à -80°C. Finalement, les tubes sont répartis comme suit :

- CUPROT 1 à X, MAS, -80, E
- CUPROT 1 à X, MAN, -80, E
- CUPROT 1 à X, CYS, -80, E
- CUPROT 1 à X, MAS, -80, R
- CUPROT 1 à X, MAN, -80, R
- CUPROT 1 à X, CYS, -80, R

e) Stockage des urines entre collecte et analyses ultérieures

Les tubes Eppendorf® assortis de la mention « -80, E » sont placés dans une boîte de stockage SARSTEDT identifiée « ETUDE CUPROT -80°C, E ». La boîte est stockée dans un congélateur dont la température est contrôlée et stable à -80°C.

Une seconde boîte identifiée et conservée de la même manière est utilisée pour les tubes identifiés « -80, R ».

f) Remise en suspension du sédiment

Immédiatement après la répartition dans les différents tubes Eppendorf[®], le sédiment du spécimen dédié à l'analyse cytologique est remis en suspension avec l'urine résiduelle (0.15mL). Pour ce faire, une alternance de pressions-dépressions lentes de la pastette plongée dans l'urine résiduelle est effectuée. L'horaire de répartition du surnageant est reporté sur la feuille analytique et est assimilé à T0.

3. Etapes analytiques immédiates

Les étapes décrites des paragraphes 7.a), 7.b) et 7.c) sont réalisées pour chaque échantillon MAS, MAN, et CYS de chaque individu inclus dans l'étude. Les résultats sont rapportés dans le tableur de résultats dont un extrait est disponible ANNEXE 4.

a) Bandelettes urinaires

Une analyse chimique est réalisée pour chaque animal au moyen d'une bandelette urinaire (Combur 10 Test[®], COBAS, Roche Diagnostics Ltd, Rotkreuz, Switzerland). Toutes les plages de réactif de la bandelette sont imbibées du surnageant d'urine une à une, la bandelette est égouttée afin d'éliminer l'excédent d'urine en veillant à ce qu'aucun mélange de réactif n'ait lieu. La bandelette est lue entre 70 et 110 secondes après imbibition des réactifs.

b) Densité urinaire

Une goutte de surnageant prélevée dans le tube d'urine à fond conique après centrifugation est utilisée pour la mesure de la densité urinaire au moyen d'un refractomètre optique Atago T2-NE (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan), dont l'étalonnage au moyen d'eau distillée est réalisé chaque jour. La valeur obtenue est consignée dans la fiche analytique.

c) Examen cytologique du sédiment

Une goutte (environ 6 μ L) du sédiment remis en suspension est transférée sur une lame à bords coupés et à plage dépolie (Thermo Scientific Menzel-Gläser) et recouverte d'une lamelle de 22 x 22 mm (Menzel-Gläser).

L'examen cytologique est réalisé au moyen d'un microscope Nikon Eclipse E200 avec les objectifs associés de grossissement x10 et x40. L'intensité lumineuse, la fermeture du diaphragme et la descente du condensateur sont réglés à leur maximum.

i. Analyse préliminaire au faible grossissement

Une première analyse semi-quantitative du spécimen est effectuée au faible grossissement (x40) du microscope dans le but d'apprécier la richesse du prélèvement et de quantifier les cristaux et cylindres si le prélèvement en contient. La surface de la lamelle est observée dans son intégralité en faisant varier la vis micrométrique afin d'effectuer un premier tri entre les éléments d'intérêt (cellules, cristaux, cylindres) et les artéfacts de préparation (bulles, débris de verre, fibres ou poils).

ii. Analyse au fort grossissement

Une analyse quantitative des éléments d'intérêt est effectuée au fort grossissement (x400). Pour ce faire, dix champs distincts sont sélectionnés en prenant soin d'éviter leur chevauchement afin de ne pas compter plusieurs fois le même élément. Sur chacun des champs, les éléments d'intérêt sont dénombrés individuellement et relevés dans une colonne du TABLEAU 2, lui-même disponible dans la feuille d'analyse de chaque chien (ANNEXE 3). Une moyenne sur les dix champs est effectuée à la fin de l'examen et constitue la donnée brute exploitée par la suite. La nature des cristaux, cylindres ou bactéries est précisée si nécessaire.

Des seuils au-delà desquels les éléments ne sont pas pris en compte sont mis en place pour chaque paramètre. Ainsi le nombre maximal de chacun des éléments comptés par champ est :

- 10 cristaux
- 100 hématies
- 50 leucocytes
- 10 cylindres
- 100 bactéries
- 10 spermatozoïdes

Afin de définir le caractère actif ou inactif du sédiment, d'autres seuils sont établis. Le sédiment est qualifié d'actif s'il contient par champ, un nombre supérieur à :

- 5 hématies, on parle alors d'hématurie microscopique
- 5 leucocytes, on parle alors de pyurie
- 5 cellules épithéliales, on déduit alors qu'il y a désquamation

TABLEAU 2 : Dénombrement des éléments d'intérêt sur 10 champs distincts pour chaque spécimen.
Examen réalisé au microscope optique, grossissement x400, entre lame et lamelle.

Eléments comptés	Champ 1	Champ 2	Champ 3	Champ 4	Champ 5	Champ 6	Champ 7	Champ 8	Champ 9	Champ 10
Cristaux (x100)										
Hématie (x400)										
Leucocytes (x 400)										
Cylindres (x100)										
Bactéries										
Spermatozoïdes										
Cellules épithéliales										

iii. Examen cytologique après coloration

Une goutte de sédiment remis en suspension est placée sur une lame propre séchée à l'air libre puis colorée par l'automate de coloration. La coloration effectuée est de type May-Grünwald Giemsa modifié. Les lames colorées sont ensuite examinées au microscope à différents grossissements afin de mettre en évidence d'éventuelles bactéries et pyurie. Les images de phagocytoses sont particulièrement recherchées et le nombre de bactéries visibles à l'examen sous immersion (grossissement x1000) est comptabilisé.

En fonction de l'examen au grossissement x1000, l'échantillon est considéré comme :

- Indemne d'ITU et de bactériurie : absence de pyurie et moins de 10 bactéries comptabilisées sur une moyenne de 20 champs ;
- Probablement indemne d'ITU : bactériurie minime avec moins de 10 bactéries sur une moyenne de 20 champs mais présence de pyurie sans image de phagocytose ;

- Suspect d'ITU : bactériurie modérée avec au moins 10 bactéries sur une moyenne de 20 champs sans pyurie ;
- Atteint d'ITU : bactériurie modérée avec au moins 10 bactéries sur une moyenne de 20 champs et pyurie et/ou images de phagocytose.

4. Détermination du RPCU

Le RPCU est mesuré avec l'analyseur Indiko Plus (ThermoFisher Scientific) au maximum 72 heures après congélation des spécimens.

La créatinine urinaire est mesurée par la méthode de Jaffé et les protéines urinaires par la méthode au rouge pyrogallol avec les réactifs de Thermo Scientific. Les valeurs de protéinurie et créatininurie sont reportées sur la feuille d'analyse.

5. SDS-AGE sur spécimen liquide

a) Réalisation

L'électrophorèse des protéines urinaires est réalisée sur des gels SDS-AGE contenant 50g/L d'agarose (Hydragel 5 proteinuria®, Sebia Italia SRL, Bagno a Ripoli, Firenze Italy) par l'analyseur correspondant (Hydrasis 2®, Sebia Italia SRL, Bagno a Ripoli, Firenze Italy).

Les échantillons sont conservés à -80°C pendant une période maximale de 360 jours avant analyse (Théron et al., 2017). Les spécimens dont la concentration en protéines est supérieure à 1,5 g/L sont dilués au 1 :1 avant réalisation de l'électrophorèse et celles dont la concentration en protéines est supérieure à 2 g/L sont dilués au 1 :2 (Le Bricon et al., 1998). Par ailleurs, la sensibilité de détection de la protéinurie par le système employé est de 15 mg/L. Afin d'obtenir l'échantillon migratoire, 80 µL de surnageant de chaque spécimen est mélangé à 20 µL de diluant fourni par le fabricant – ce diluant contient du et du bleu de bromophénol.

Les cinq puits de chaque gel sont remplis dans l'ordre suivant, de gauche à droite :

- Puit n°1, noté MAS : 5 µL du spécimen récolté par miction naturelle simple ;
- Puit n°2, noté MAN : 5 µL du spécimen récolté par miction naturelle après nettoyage de la sphère uro-génitale ;
- Puit n°3, noté CYS : 5 µL du spécimen récolté par cystocentèse, noté CYS ;

- Puit n°4, non annoté : non utilisé ;

- Puit n°5, noté MM : 5 μ L de solution contrôle de masse moléculaire (Molecular mass control®, Sebia) contenant du lysozyme (14,3 kDa), de la triose-phosphate isomérase (26.6 kDa), de l'albumine bovine (66 kDa) et de l'Immunoglobuline G (Ig G) humaine (150 kDa).

Les puits de chaque gel sont annotés par l'acronyme correspondant à la solution qu'ils contiennent ; la date de réalisation de l'électrophorèse et le numéro correspondant au chien de l'étude sont également écrites de façon indélébile sur le gel (FIGURE 1).

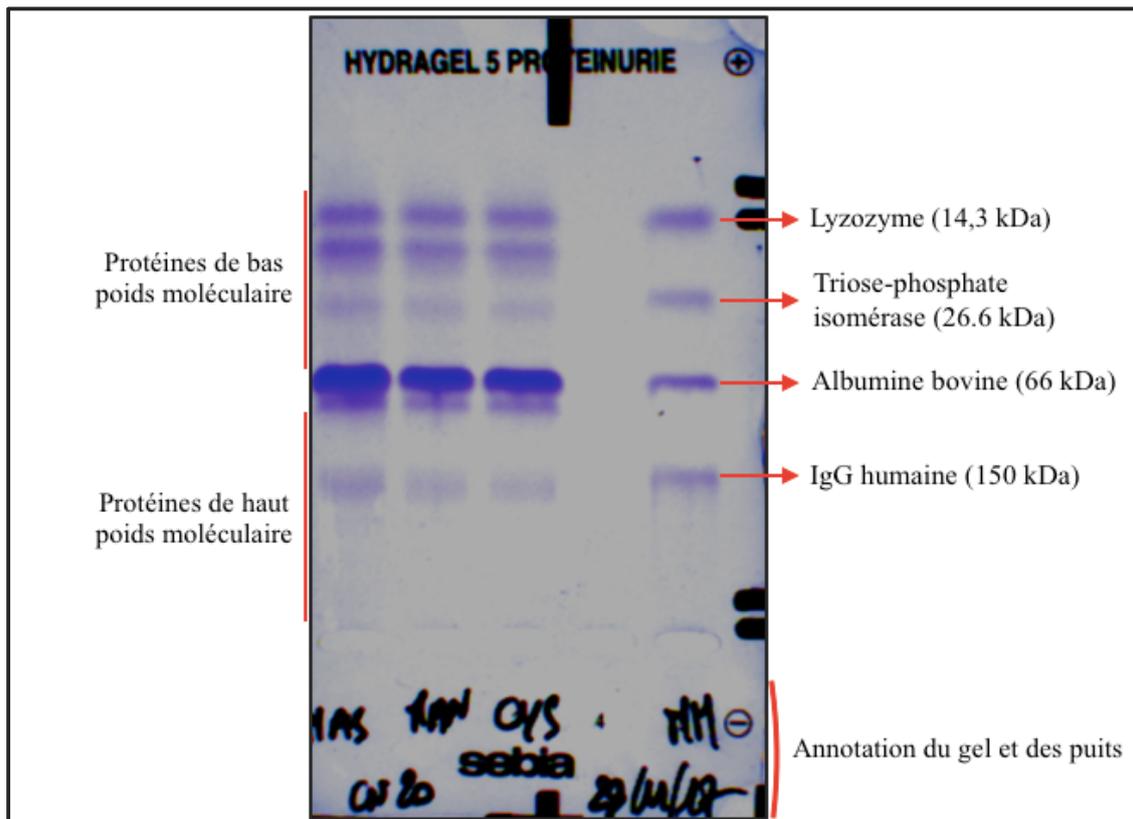


FIGURE 1 : Gel d'électrophorèse de type SDS-AGE du spécimen CN20.

Présentation des protéines contenues dans l'échantillon témoin et des différents types de protéines obtenues. Les puits sont annotés en fonction du mode de prélèvement du spécimen qu'ils contiennent (MAS : Miction naturelle simple ; MAN : Miction naturelle après nettoyage ; CYS : cystocentèse). La date et le numéro d'étude du chien sont rapportés en dessous de la zone de lecture du gel.

Une fois le gel placé dans l'analyseur et celui-ci correctement préparé, le gel suit une migration à puissance constante de 10 Watts à 20°C (soit 60 volts/h) pendant 15 minutes. A la fin de la migration, le gel est transféré dans la chambre de coloration de l'analyseur où un programme de coloration automatique du gel est initié. Le gel est ensuite rincé et traité à la glycérine 15% pour favoriser sa bonne conservation. Il est alors immédiatement scanné puis

conservé dans un classeur dédié à température ambiante, dans un endroit sec et dans l'obscurité ; chaque gel est accompagné d'une feuille de gel comportant le numéro d'étude et la date.

b) Interprétation des résultats

Une interprétation visuelle de chaque gel est effectuée indépendamment par deux opérateurs différents : Rachel Lavoué et Mathilde Lajoinie. La luminosité est diminuée et le contraste augmenté afin de favoriser la visualisation des bandes (FIGURE 2). Pour chaque gel, les bandes de protéines correspondant aux échantillons MAS, MAN et CYS sont comptées puis classées en fonction de leur masse moléculaire. Une bande de masse moléculaire d'environ 68 kDa est identifiée comme correspondant à l'albumine, les protéines de masse moléculaire supérieur à celui de l'albumine sont dites de haute masse moléculaire et celles de masse moléculaire inférieur à celui de l'albumine sont dites de faible masse moléculaire. La présence d'une bande d'albumine est considérée pathologique et compatibles avec une glomérulopathie uniquement dans le cas où elle est intense Elle est jugée physiologique dans le cas où elle est de faible intensité. La présence d'une bande de faible intensité de 25 à 30 kDa chez les chiens mâles entiers est considérée physiologique.

A l'issue de la lecture des gels d'électrophorèse, les profils sont classés en quatre types de profils en fonction des protéines présentes :

- Profil physiologique : absence de protéinurie ou albuminurie physiologique – c'est-à-dire présence d'une bande d'albumine peu marquée – et/ou présence d'une bande de faible intensité correspondant à une protéine de 25 à 30 kDa chez les chiens mâles ;
- Profil compatible avec une glomérulopathie : présence d'une bande d'albumine intense et/ou de bandes correspondant à des protéines de haute masse moléculaire ;
- Profil compatible avec une tubulopathie : présence de bandes correspondant à des protéines de faible masse moléculaire uniquement ;
- Profils mixtes : présence de bandes de faible masse moléculaire conjointement à la présence d'une bande intense d'albumine et/ou de bandes de haute masses moléculaires.

Les profils sont ensuite déterminés comme identiques ou différents en fonction du mode de collecte des urines. En cas de différence, celle-ci est jugée significative dans le cas où elle conduit à classer les profils d'un même chien dans différentes catégories.

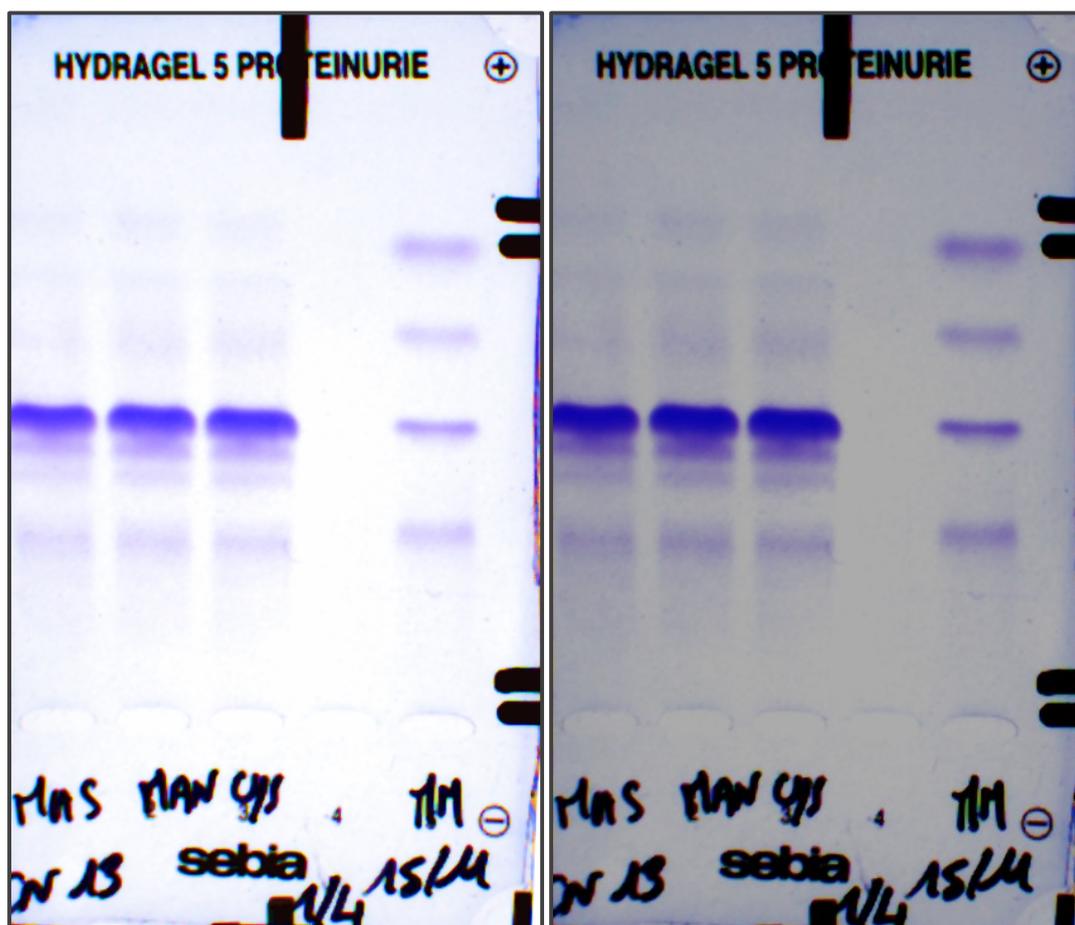


FIGURE 2 : Gels d'électrophorèse de type SDS-AGE du spécimen CN13 en fonction du contraste et de la luminosité de l'image.

6. Statistiques

La présence de corrélations entre certaines variables – la densité urinaire et la concentration en protéines urinaires – et le type de profil électrophorétique des protéines urinaires a été recherchée. Pour ce faire, les spécimens ont été séparés en catégories de RPCU (physiologique, douteux et pathologique) puis, pour chaque catégorie, répartis en trois groupes différents : absence de bandes, présence de bandes physiologiques ou présence de bandes non physiologiques. Des corrélations ont ensuite été recherchées par ANOVA ; en cas d'association, les groupes de profils ont été comparés deux à deux grâce à un test Tukey. Le logiciel XLSTAT a été utilisé et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme significatives.

Ces études ont été menées pour chacune des catégories de RPCU pour lesquelles au moins deux groupes de profils ont pu être établis.

C. Résultats

1. Description de la population

a) Motifs d'inclusion

Soixante-deux chiens ont été initialement inclus dans l'étude. Aucun trouble urinaire n'était rapporté chez cinquante-deux d'entre eux, l'analyse urinaire a alors été réalisée dans le cadre d'un bilan de santé. Ces animaux étaient présentés à l'ENVT pour chirurgie de convenance, pathologies infectieuses, auto-immunes, néoplasies ou troubles dysendocriniens – les motifs de présentation des animaux sont disponibles ANNEXE 5. Dix animaux étaient, quant à eux, présentés pour suspicion de troubles urinaires incluant protéinurie (3 individus), polyuro-polydypsie (2), insuffisance rénale aigue (3), infection du tractus urinaire (2), hématurie, strangurie et pollakiurie (1). Certains animaux présentaient plusieurs motifs de présentation.

b) Motifs d'exclusion

Quatre chiens présentaient une hématurie macroscopique à la miction et ont donc été exclus de l'étude.

c) Epidémiologie de la population

TABLEAU 3 : Répartition des gabarits en fonction du sexe des individus de l'étude.

	Gabarit 1	Gabarit 2	Gabarit 3
<i>Femelle entière</i>	4	8	1
<i>Femelle stérilisée</i>	7	7	1
<i>Mâle entier</i>	2	18	5
<i>Mâle castré</i>	1	3	0
TOTAL	15	35	8

Finalement, 57 chiens ont été inclus dans l'étude. L'échantillon compte 28 femelles dont 10 stérilisées et 29 mâles dont 25 stérilisés. L'âge médian des animaux de l'étude est de 5,95 ans [0,55-11,58]. Le gabarit 2 est le plus représenté ; 14 animaux sont de gabarit 1 (25%), 36 animaux sont de gabarit 2 (63%) et 7 animaux sont de gabarit 3 (12%). La répartition des gabarits en fonction du sexe des animaux est présentée TABLEAU 3.

2. Collecte des urines

L'ensemble des spécimens a été récolté sans difficulté. Le délai médian entre la collecte du premier spécimen (MAS) et du dernier spécimen (CYS) est de 25 minutes [5-295].

3. Electrophorèse des protéines urinaires

a) Influence du mode de collecte sur l'électrophorèse des protéines urinaires

Quatre des 57 individus de l'étude présentent des différences d'interprétation en fonction du mode de collecte des urines. Ces quatre individus ont un RPCU $< 0,2$, c'est-à-dire qu'ils sont non protéinuriques.

Pour deux d'entre eux (individus 55 et 58), les profils des spécimens prélevés par cystocentèse (CYS) et miction naturelle après nettoyage de la sphère uro-génitale (MAN) sont identiques entre eux mais différent du profil du spécimen obtenu par miction naturelle simple (MAS). Dans le premier cas, le profil MAS révèle une bande de faible intensité d'environ 68 kDa alors que les profils MAN et CYS ne révèlent aucune bande. Les trois profils ont été catégorisés comme physiologiques. Dans le second cas, le profil MAS met en évidence une bande de 68 kDa faiblement marquée et trois bandes de faible masse moléculaire tandis que les profils MAN et CYS mettent en évidence une bande de 68 kDa marquée et une bande de faible masse moléculaire. Le premier profil est donc compatible avec une tubulopathie alors que les deux autres sont mixtes. Par ailleurs, aucune différence notable entre les résultats de l'analyse urinaire (densité, bandelette et sédiment) n'est notée entre les trois spécimens de ces deux individus.

Pour deux d'entre eux (individus 18 et 41), les profils des spécimens prélevés par miction naturelle avec ou sans nettoyage de la sphère uro-génitale sont identiques entre eux mais différent du profil du spécimen obtenu par cystocentèse. Dans le premier cas, les profils mettent tous en évidence une seule bande d'environ 68 kDa qui est de très faible intensité sur les profils MAS et MAN et plus marquée mais restant de faible intensité sur le profil CYS. Les trois profils ont donc été classés comme physiologiques. Dans le second cas, les profils MAS et MAN mettent en évidence une bande d'environ 68 kDa de forte intensité ainsi que des bandes d'environ 30 et 12 kDa tandis que le profil CYS met en évidence une seule bande de faible intensité, d'environ 68 kDa. Les profils ont donc respectivement été classés dans les catégories « profil mixte » et « profil physiologique ». Chez ce chien, la densité urinaire des spécimens

MAS et MAN est de 1,050 tandis qu'elle est de 1,006 pour le spécimen CYS. L'analyse du culot urinaire ne révèle ni anomalie ni différence d'interprétation, notamment elle ne révèle pas la présence d'un sédiment actif ou d'une molécule métaboliquement active dans le spécimen CYS.

b) RPCU *versus* électrophorèse des protéines urinaires

Une comparaison des RPCU et des analyses des profils électrophorétiques sur les 174 échantillon d'urine provenant des 57 individus de notre étude est disponible TABLEAU 4.

TABLEAU 4 : Confrontation des résultats de l'électrophorèse des protéines urinaires (EPU) au rapport des protéines sur créatinine urinaires (RPCU) pour chaque spécimen quelque soit son mode de prélèvement. Les résultats sont exprimés en nombre de spécimens.

RPCUEPU	Physiologique	Tubulaire	Glomérulaire	Mixte	TOTAL
<i>Normal</i>	88	9	12	8	117
<i>Douteux</i>	0	2	12	8	22
<i>Pathologique</i>	0	0	13	22	35
TOTAL	88	11	37	38	174

Cent dix-sept spécimens (67%) ont un RPCU physiologique (*i.e.* <0,2). Pour 88 d'entre eux (75%), le profil électrophorétique des protéines urinaires est physiologique – c'est-à-dire qu'il ne révèle pas de bandes de protéines ou une bande d'environ 68 kDa unique et faiblement marquée et/ou, lorsque l'individu est un mâle entier, une bande de 25 à 30 kDa de faible intensité. Neuf profils (8%) ne comportent que des bandes de faible masse moléculaire (compatibles avec une tubulopathie), Douze (10%) ne comportent que des bandes de haute masse moléculaire (évoquant une glomérulopathie) et huit (7%) sont de type mixte.

Vingt-deux échantillons (13%) ont un RPCU douteux (*i.e.* >0,2 et <0,5). Parmi ceux-ci, aucun profil n'est considéré comme physiologique, deux profils (9%) présentent des bandes de faible masse moléculaire uniquement, douze (55%) présentent des bandes de haute masse moléculaire uniquement et huit (36%) présentent des bandes de masses moléculaires mixtes.

Trente-cinq échantillons (20%) ont un RPCU anormalement élevé (>0,5). Parmi ceux-là, treize (37%) présentent un profil compatible avec une glomérulopathie et vingt-deux (63%) présentent un profil compatible avec une atteinte mixte. Parmi ces échantillons protéinuriques, vingt-et-un ont un RPCU supérieur à 2. Le profil électrophorétique des protéines urinaires de

ces échantillons est de type glomérulaire pour six d'entre deux et mixte avec une prédominance de protéines de haute masse moléculaire pour quinze d'entre eux.

c) Densité et électrophorèse des protéines urinaires

L'influence de la densité urinaire sur le profil électrophorétique des protéines urinaires a été étudiée sur les 117 spécimens non protéinuriques (RPCU<0,2). Ceux-ci ont été classés en trois groupes en fonction de leurs profils électrophorétiques – profils exempts de toute bande (n=39, soit 33%), profils ne comprenant que des bandes physiologiques (n=49, soit 42%) ou profils présentant des bandes pathologiques (n=29, soit 25%) – et les densités urinaires des spécimens de chaque groupe ont été statistiquement comparées. Il en résulte que les densités urinaires des spécimens sont significativement différentes entre les groupes ; notamment, la différence de densité urinaire entre les profils exempts de toute bande et les profils présentant des bandes pathologiques est hautement significative. Cette étude n'a pas pu être réalisée pour les spécimens ayant un RPCU douteux ou pathologique puisque tous les profils associés présentent des bandes non pathologiques. Les données relatives à cette étude sont disponibles TABLEAU 5.

TABLEAU 5 : Influence de la densité urinaire sur le profil électrophorétique des protéines urinaires.

	Absence de bande	Bandes physiologiques	Profils pathologiques
<i>Effectif</i>	39	49	29
<i>Densité urinaire</i>			
<i>médiane</i>	1,015	1,030	1,037
<i>minimale</i>	1,005	1,006	1,014
<i>maximale</i>	1,050	1,050	1,050
<i>p-value</i>	0,009		
		0,049	
	< 0,0001		< 0,0001

d) Concentration en protéines urinaires et électrophorèse des protéines urinaires

L'influence de la concentration en protéines urinaires sur le profil électrophorétique des protéines urinaires a été étudiée sur les 117 spécimens non protéinuriques (RPCU<0,2). Ceux-ci ont été classés en trois groupes en fonction de leurs profils électrophorétiques – profils exempts de toute bande (n=39, soit 33%), profils ne comprenant que des bandes physiologiques (n=49, soit 42%) ou profils présentant des bandes pathologiques (n=29, soit 25%) – et les concentrations en protéines urinaires des spécimens de chaque groupe ont été statistiquement

comparées. Il en résulte que les concentrations en protéines urinaires des spécimens sont significativement différentes entre les groupes. Cette étude n'a pas pu être réalisée pour les spécimens ayant un RPCU douteux ou pathologique puisque tous les profils associés présentent des bandes non pathologiques. Les données relatives à cette étude sont disponibles TABLEAU 6.

TABLEAU 6 : Influence de la concentration en protéines urinaires sur le profil électrophorétique des protéines urinaires.

	Absence de bande	Bandes physiologiques	Profils pathologiques
<i>Effectif</i>	39	49	29
<i>Protéinurie</i>			
<i>médiane</i>	50	113	215
<i>minimale</i>	15	18	492
<i>maximale</i>	140	492	802
<i>p-value</i>	0,007		
		< 0,0001	
	< 0,0001		< 0,0001

D. Discussion

Dans notre étude, le mode de collecte des urines n'a pas d'influence sur le profil électrophorétique des protéines urinaires dans 93% des cas (53/57). Pour chacun des cas pour lesquels il existe une variation en fonction du mode de collecte, un seul profil diffère des deux autres. Dans deux cas, le profil différent des autres est celui réalisé à partir du spécimen obtenu par miction naturelle sans nettoyage préalable de la sphère uro-génitale. Dans deux autres cas, c'est celui issu du spécimen obtenu par cystocentèse.

Néanmoins, les différences d'intensité ou de présence de bandes n'aboutissent pas toujours à des différences d'interprétation des gels. Dans notre étude, seulement deux chiens sont classés dans des catégories de protéinurie différentes à la seule lecture de leur profil électrophorétique urinaire. Pour l'un d'entre eux le profil issu du prélèvement par miction spontanée non nettoyée diffère des deux autres sans qu'aucune explication ne soit trouvée à la lecture de la bandelette urinaire ou du culot. Pour le second individu, c'est le profil réalisé à partir du prélèvement par cystocentèse qui diffère des autres. Dans ce dernier cas, la densité des spécimens obtenus par miction naturelle est nettement plus haute que celle du spécimen obtenu par cystocentèse.

Une étude a déjà mentionné la recrudescence de SDS-AGE faussement positifs – c'est-à-dire de profils électrophorétiques pathologiques chez des animaux non protéinuriques – lorsque la densité urinaire augmente (Giori et al., 2011). Afin d'évaluer cette hypothèse, une corrélation entre densité urinaire et résultats du SDS-AGE a été recherchée chez les animaux non protéinuriques de notre étude. Il en résulte que la probabilité que les profils issus de spécimens non protéinuriques présente des bandes de protéines – physiologiques ou non – est plus importante lorsque la densité urinaire est élevée. Aussi, la probabilité que ces bandes soient considérées comme pathologiques est plus importante lorsque la densité est élevée.

Par conséquent, concernant l'individu pour lequel les profils électrophorétiques diffèrent significativement entre spécimen obtenu par cystocentèse et spécimens obtenus par miction, la différence de densité urinaire semble être à l'origine de cette variation des profils. Finalement, la seule différence entre les profils jugée significative, qui ne peut être expliquée par les résultats de l'analyse des densité, bandelette et sédiment urinaires, concerne un spécimen prélevé par miction naturelle sans nettoyage préalable. Il semble donc possible de réaliser l'électrophorèse des protéines urinaires à partir d'urines obtenues par miction spontanée, de préférence après nettoyage rigoureux de la sphère uro-génitale.

Dans notre étude, à l'exception de l'individu susmentionné, les spécimens d'un même individu avaient des densités urinaires comparables quel que soit leur mode de collecte. Cette influence de la densité urinaire n'a donc pas perturbé l'analyse de l'influence du mode de collecte des urines sur leur profil électrophorétique. Néanmoins, une standardisation de la densité urinaire semble nécessaire avant réalisation des SDS-AGE à visée diagnostique, pour ce faire, une étude prospective visant à étudier les gammes de densité autour desquelles le nombre de faux positifs est le plus faible semble nécessaire.

De même, à RPCU constant, la concentration en protéines urinaires a une influence sur la présence de bandes physiologiques ou non sur le profil électrophorétique sur gel d'agarose. Effectivement, la quantité de protéines migrant sur le gel est directement corrélée à la concentration urinaire en protéines et non au RPCU. Une étude prospective semble nécessaire afin de standardiser la quantité de protéines urinaires optimale.

Aussi, nous avons constaté la présence d'une bande de faible intensité d'environ 25 kDa chez 15 des 16 mâles entiers non protéinuriques de notre étude. Ceci est en accord avec l'hypothèse de l'excrétion d'arginine estérase canine physiologique chez les mâles entiers (Schellenberg et al., 2011). La convergence d'études dont nous disposons actuellement semble

justifier que la présence d'une bande d'environ 25 kDa de faible intensité soit considérée comme physiologique chez le chien entier ou castré depuis moins de 15 jours (Groue, 2016 ; Piane et al., 2013).

En outre, l'analyse comparée du RPCU et des profils électrophorétiques des protéines urinaires des 57 spécimens de l'étude confirme les observations précédemment réalisées. Tout d'abord, l'électrophorèse des protéines urinaires ne permet pas de se prévaloir de la détermination préalable du RPCU (Giori et al., 2011). Dans notre étude, 25% des profils non protéinuriques (88/117) présentent des bandes de protéines non physiologiques sur leur profil électrophorétique des protéines urinaires et auraient été considérés comme protéinuriques à la seule lecture de l'électrophorèse. Aussi, les 21 spécimens de notre étude dont le RPCU était supérieur à 2 présentaient un profil électrophorétique glomérulaire ou mixte à prédominance glomérulaire ; ceci est en accord avec le postulat qu'après exclusion d'une protéinurie post-rénale, un $\text{RPCU} > 2$ est fortement en faveur d'une atteinte glomérulaire (Grauer, 2011 ; Lees et al., 2005). Enfin, aucun des 22 spécimens *limite protéinuriques* – au RPCU douteux – ne présente un profil électrophorétique sans anomalie confortant l'idée que le SDS-AGE peut être plus précoce que le RPCU dans la détection d'une protéinurie (Schultze and Jensen, 1989).

Une des limites de notre étude réside dans le faible nombre d'individus protéinuriques dans notre population et donc le faible nombre de profils effectivement pathologiques. Néanmoins, aucun des profils électrophorétiques issus d'individus protéinuriques ou limite protéinuriques ne différaient en fonction du mode de collecte des urines et seulement une différence significative à la lecture des gels reste inexplicée par les éléments de l'analyse urinaire. L'homogénéité de nos résultats obtenus sur 57 individus nous permet donc de conclure à la validation du protocole de nettoyage employé dans cette étude afin de réaliser l'électrophorèse des protéines urinaires à partir de spécimens collectés par miction naturelle lorsque le prélèvement n'est pas macroscopiquement hématurique.

Cette étude s'inscrit dans la lignée d'un projet visant à préciser les conditions pré-analytiques nécessaires à l'analyse complète des urines du chien. Nous prouvons ici que les urines ne doivent pas forcément être récoltées par cystocentèse pour interpréter l'électrophorèse des protéines mais qu'elles peuvent être collectées par miction spontanée à condition d'avoir préalablement réalisé un nettoyage rigoureux de la zone uro-génitale et exclu les prélèvements macroscopiquement hématuriques. Ainsi, nous proposons une alternative à la répétition de cystocentèses, permettant d'augmenter le confort de l'animal en diminuant la réalisation d'actes

invasifs et le stress qu'ils peuvent engendrer mais aussi celui du propriétaire qui peut réaliser les prélèvements à son domicile et les envoyer directement au laboratoire. Aussi, les animaux nécessitant des électrophorèses des protéines urinaires répétées sont majoritairement des chiens suivis au long cours ; en simplifiant la réalisation du suivi médical dont ils ont besoin, nous augmentons les chances d'obtenir une bonne observance de la part des propriétaires.

Outre la facilitation du suivi médical des animaux présentant une protéinurie d'origine rénale, la validation de ce protocole ouvre la possibilité de réaliser de nombreuses études cliniques sur la protéinurie et les atteintes rénales lors de co-affections. Effectivement, la cystocentèse est un acte modérément invasif qui ne peut être éthiquement réalisé uniquement sur les individus le nécessitant pour des raisons médicales ; néanmoins, un prélèvement d'urines par miction naturelle après nettoyage de la sphère uro-génitale n'est ni invasif ni stressant pour l'animal et semble donc éthiquement réalisable dans un contexte d'études cliniques, même si les animaux ne nécessitent pas de prélèvement d'urines pour leur propre suivi médical.

CONCLUSION

L'électrophorèse des protéines urinaires est intéressant pour la localisation d'une protéinurie rénale. Il s'agit d'une technique à la fois peu coûteuse et peu invasive permettant de suivre l'évolution d'affections rénales en respectant le confort de l'animal. Néanmoins, peu d'études sont disponibles quant aux conditions pré-analytiques nécessaires à sa réalisation. Cette étude a permis de valider la réalisation d'électrophorèse à partir d'urines collectées par miction naturelle après nettoyage rigoureux de la sphère uro-génitale.

La perspective de cette étude est double. D'une part, elle permet d'améliorer les conditions de réalisation du suivi des animaux présentant une protéinurie d'origine rénale tant pour les animaux que pour leurs propriétaires. En effet, après explication des techniques de nettoyage, la collecte des urines peut être réalisée directement par le propriétaire, à son domicile. Pour l'animal, ceci permet d'alléger le stress inhérent à la venue en clinique vétérinaire et à la réalisation d'une cystocentèse ; pour le propriétaire, ceci permet de diminuer le coût et le temps dédié au suivi médical de son animal. D'autre part, la validation d'un protocole non invasif pour la réalisation d'électrophorèses des protéines urinaires permet de réaliser éthiquement des études cliniques sur l'utilisation de cet outil, notamment dans le cas de co-affections, sans soumettre l'animal à des prélèvements invasifs non nécessités par sa condition clinique.

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

Je soussignée, **Rachel LAVOUE**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Mathilde LAJOINIE** intitulée « Etude prospective sur l'influence du mode de collecte des urines sur le profil électrophorétique sur le gel d'agarose des protéines urinaires chez le chien » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 5 octobre 2018
Docteur Rachel LAVOUE
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



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



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur ~~Jean-Louis~~ VINEL,
La Vice-Présidente de la CFVU



Mlle Mathilde LAJOINIE
a été admis(e) sur concours en : 2013
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 16/03/2017
a validé son année d'approfondissement le : 12/07/2018
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

BARRIL, Patricia, et Silvia NATES. « Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities ». In *Quantitative Analysis of Electrophoresis Data - Application to Sequence-Specific Ultrasonic Cleavage of DNA.*, 3-14. INTECH Open Access Publisher, 2012.

BEATRICE, Laura, Francesca NIZI, Daniela CALLEGARI, Saverio PALTRINIERI, Eric ZINI, Paola D'IPPOLITO, et Andrea ZATELLI. « Comparison of Urine Protein-to-Creatinine Ratio in Urine Samples Collected by Cystocentesis versus Free Catch in Dogs ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236, n° 11 (juin 2010): 1221-24. <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1221>.

BERISTAIN-RUIZ, Diana M., Elena CARRETÓN, Carlos A. RODRÍGUEZ-ALARCÓN, José A. MONTOYA-ALONSO, et Rafael BARRERA. « SDS-PAGE Analysis of Urinary Proteins in Dogs with Heartworm Disease ». *Iranian Journal of Veterinary Research*, n° 3 (septembre 2013). <https://doi.org/10.22099/ijvr.2013.1689>.

BOTTINI, Paula V., Maria Almerinda V.F. RIBEIRO-ALVES, et Celia R. GARLIPP. « Electrophoretic Pattern of Concentrated Urine: Comparison between 24-Hour Collection and Random Samples ». *American Journal of Kidney Diseases* 39, n° 1 (janvier 2002): e2.1-e2.4. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2002.29920>.

BRIGDEN, Malcolm L., Evelyn D. NEAL, Michael D. MCNEELY, et Gordon N. HOAG. « The Optimum Urine Collections for the Detection and Monitoring of Bence Jones Proteinuria ». *American Journal of Clinical Pathology* 93, n° 5 (mai 1990): 689-93.

BROWN, JS, Mary B. NABITY, R. BROCK, Rachel CIANCOLO, George E. LEES. « Comparison of urine SDS-PAGE with renal histological findings and clinicopathologic data in dogs with renal disease ». *Veterinary Clinical Pathology* 39, n° 4 (décembre 2010): 556. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00257.x>.

CAMARÉ, Caroline, et Elizabeth CAUSSÉ. « Urinary protein electrophoresis, which analysis to select? A simplified interpretation ». *Annales de Biologie Clinique*, n° 6 (201311-12): 667–678. <https://doi.org/10.1684/abc.2013.0913>.

CARAGELASCO, Douglas S., Márcia M. KOGIKA, Cínthia R. MARTORELLI, Khadine K. KANAYAMA, et Denise M.N. SIMÕES. « Urine protein electrophoresis study in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism during therapy with trilostane ». *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37, n° 7 (juillet 2017): 734-40. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000700014>.

CHRAMBACH, Andreas C., Ralph A. REISFELD, Mary M. WYCKOFF, et June ZACCARI. « A Procedure for Rapid and Sensitive Staining of Protein Fractionated by Polyacrylamide Gel

Electrophoresis ». *Analytical Biochemistry* 20, n° 1 (juillet 1967): 150-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90272-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90272-2).

CIANCIOLO, Rachel, Jessica HOKAMP, et Mary NABITY. « Advances in the Evaluation of Canine Renal Disease ». *The Veterinary Journal* 215 (septembre 2016): 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.012>.

DELANGHE, Joris, et Marijn SPEECKAERT. « Preanalytical requirements of urinalysis ». *Biochemia Medica*, 2014, 89-104. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.011>.

DIEMER, Margot. « Etude visant à préciser l'influence du mode de collecte des urines sur leur analyse physico-chimique et cytologique chez le chien. » Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017.

DUFFY, Maura E., Andrew SPECHT, et Richard C. HILL. « Comparison between Urine Protein: Creatinine Ratios of Samples Obtained from Dogs in Home and Hospital Settings ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29, n° 4 (juillet 2015): 1029-35. <https://doi.org/10.1111/jvim.12836>.

GIORI, Luca, Flavia Marcella TRICOMI, Andrea ZATELLI, Xavier ROURA, et Saverio PALTRINIERI. « 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* 23, n° 4 (juillet 2011): 682-90. <https://doi.org/10.1177/1040638711407900>.

GRAUER, Gregory F. « Proteinuria: Implications for management ». In *Kirk's current veterinary therapy. XIV*, 860–863. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders, 2009.

GRAUER, Gregory F. « Proteinuria: Measurement and Interpretation ». *Topics in Companion Animal Medicine* 26, n° 3 (août 2011): 121-27. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>.

GROUE, Adèle. « Profil électrophorétique des protéines des urines du chien mâle entier et castré. » Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016.

GURSKÉ, William A., Cynthia R. BLESSUM, Min-Lee CHENG, et Mark S. ANDRADE. « High resolution electrophoretic gel and method for separating serum proteins ». *Beckman Instruments Inc.* 74, n° 744 (1989).

HOKAMP, Jessica A., Rachel E. CIANCIOLO, May M. BOGGESS, George E. LEES, Silvia L. BENALI, Marselle KOVARSKY, et Mary B. NABITY. « Correlation of Urine and Serum Biomarkers with Renal Damage and Survival in Dogs with Naturally Occurring Proteinuric Chronic Kidney Disease ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30, n° 2 (mars 2016): 591-601. <https://doi.org/10.1111/jvim.13832>.

IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup, Meryl P. LITTMAN, Sylvie DAMINET, Gregory F. GRAUER, George E. LEES, et Astrid M. VAN DONGEN. « Consensus

Recommendations for the Diagnostic Investigation of Dogs with Suspected Glomerular Disease ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27 (novembre 2013): S19-26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>.

JACOB, Frédéric, David J. POLZIN, Carl A. OSBORNE, James D. NEATON, Claudia A. KIRK, Timothy A. ALLEN, et Laurie L. SWANSON. « Evaluation of the Association between Initial Proteinuria and Morbidity Rate or Death in Dogs with Naturally Occurring Chronic Renal Failure ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226, n° 3 (1 février 2005): 393-400.

JATURAKAN, Orapun, Manisin VANICHWATANARAMLOUK, Arunrat KORNKAEW, Monkon TRISIROJ, Winai CHANSAISAKORN, Siripen KOMOLVANICH, Kittipong TACHAMPA, et Chollada BURANAKARL. « SDS-PAGE Electrophoresis for Urinary Protein Analysis in Dogs with Chronic Kidney Disease and Urinary Tract Infection ». *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 43, n° 1 (2013): 75-83.

JENKINS, Margaret A. « Serum and Urine Electrophoresis for Detection and Identification of Monoclonal Proteins ». *The Clinical Biochemist. Reviews* 30, n° 3 (août 2009): 119-22.

KANIA, Kasia, Elizabeth A. Byrnes, John P. BEILBY, Steve A.R. WEBB, et Kimberley J. STRONG. « Urinary Proteases Degrade Albumin: Implications for Measurement of Albuminuria in Stored Samples ». *Annals of Clinical Biochemistry* 47, n° 2 (1 mars 2010): 151-57. <https://doi.org/10.1258/acb.2009.009247>.

LAFONT, René. « Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules ». *Biologie et Multimédia* (blog). Consulté le 17 juin 2018. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E1.html>.

LAFONT, René. « Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules ». *Biologie et Multimédia* (blog). Consulté le 17 juin 2018. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html>.

LAVOUE, Rachel, Catherine TRUMEL, Pascale M. Y. SMETS, Jean-Pierre BRAUN, Luca ARESU, Sylvie DAMINET, Didier CONCORDET, Florence PALANCHE, et Dominique PEETERS. « Characterization of Proteinuria in Dogue de Bordeaux Dogs, a Breed Predisposed to a Familial Glomerulonephropathy: A Retrospective Study ». Édité par Maria Pia Rastaldi. *PLOS ONE* 10, n° 7 (16 juillet 2015): e0133311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133311>.

LE BRICON, Thierry, Danielle ERLICH, Djaouida BENGOUFA, Michelle DUSSAUCY, Jean-Pierre GARNIER, et Bernard BOUSQUET. « Sodium Dodecyl Sulfate-Agarose Gel Electrophoresis of Urinary Proteins: Application to Multiple Myeloma ». *Clinical Chemistry* 44, n° 6 Pt 1 (juin 1998): 1191-97.

LEE, Richard S., Flavio MONIGATTI, Andrew C. BRISCOE, Zachary WALDON, Michael R. FREEMAN, et Hanno STEEN. « Optimizing Sample Handling for Urinary Proteomics ».

Journal of Proteome Research 7, n° 9 (5 septembre 2008): 4022-30.
<https://doi.org/10.1021/pr800301h>.

LEES, George E., Scott A. BROWN, Jonathan ELLIOTT, Gregory E. GRAUER, Shelly L. VADEN, et American College of Veterinary Internal Medicine. « Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal) ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, n° 3 (juin 2005): 377-85.

LEES, George E., Rachel E. CIANCIOLO, et Fred J. CLUBB. « Renal Biopsy and Pathologic Evaluation of Glomerular Disease ». *Topics in Companion Animal Medicine* 26, n° 3 (août 2011): 143-53. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.006>.

LEFEBVRE, Hervé. « Physiologie rénale ». Consulté le 17 juin 2018.
http://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/2008/10/presentation_generale.pdf

LEVINE, Dana N., Daowen ZHANG, Tonya HARRIS, et Shelly L. VADEN. « The Use of Pooled vs Serial Urine Samples to Measure Urine Protein:Creatinine Ratios ». *Veterinary Clinical Pathology* 39, n° 1 (mars 2010): 53-56. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00167.x>.

LEVINSON, Stanley S. « Urine Protein Electrophoresis and Immunofixation Electrophoresis Supplement One Another in Characterizing Proteinuria ». *Annals of Clinical and Laboratory Science* 30, n° 1 (janvier 2000): 79-84.

MADDENS, Bert E.J., Sylvie DAMINET, Kristel DEMEYERE, Dieter DEMON, Pascale SMETS, et Evelyne MEYER. « Validation of Immunoassays for the Candidate Renal Markers C-Reactive Protein, Immunoglobulin G, Thromboxane B2 and Retinol Binding Protein in Canine Urine ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134, n° 3-4 (avril 2010): 259-64. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.003>.

MARKS, Stanley L., Peter F. MOORE, Debra W. TAYLOR, et Robert J. MUNN. « Nonsecretory Multiple Myeloma in a Dog: Immunohistologic and Ultrastructural Observations ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 9, n° 1 (janvier 1995): 50-54. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1995.tb03272.x>.

MCCAWE, D. L., D. W. KNAPP, et J. E. HEWETT. « Effect of Collection Time and Exercise Restriction on the Prediction of Urine Protein Excretion, Using Urine Protein/Creatinine Ratio in Dogs ». *American Journal of Veterinary Research* 46, n° 8 (août 1985): 1665-69.

MURGIER, Philippe, Amanda JAKINS, Nicholas BEXFIELD, et Joy ARCHER. « Comparison of Semiquantitative Test Strips, Urine Protein Electrophoresis, and an Immunoturbidimetric Assay for Measuring Microalbuminuria in Dogs ». *Veterinary Clinical Pathology* 38, n° 4 (décembre 2009): 485-92. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00176.x>.

NABITY, Mary B., May M. BOGGESS, Clifford E. KASHTAN, et George E. LEES. « Day-to-Day Variation of the Urine Protein: Creatinine Ratio in Female Dogs with Stable Glomerular Proteinuria Caused by X-Linked Hereditary Nephropathy ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, n° 3 (mai 2007): 425-30. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb02985.x>.

PIANE, L, Catherine TRUMEL, Marie-Laure THERON, Laetitia LUCARELLI, Rémi HENRION et Rachel LAVOUE. « Effect of sex on urine protein electrophoresis in dogs: a preliminary study ». *Veterinary Clinical Pathology* 29, n° 4 (novembre 2013): 24-25.

RATNAKAR, Singh, C. BANUPRIYA, Peroumal DOURERADJOU, S. VIVEKANANDAM, M.K. SRIVASTAVA, et Bidhan C. KONER. « Evaluation of Anxiety, Depression and Urinary Protein Excretion among the Family Caregivers of Advanced Cancer Patients ». *Biological Psychology* 79, n° 2 (octobre 2008): 234-38. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2008.06.001>.

ROSSI, Gabriele, Luca GIORI, Simona CAMPAGNOLA, Andrea ZATELLI, Eric ZINI, et Saverio PALTRINIERI. « Evaluation of Factors That Affect Analytic Variability of Urine Protein-to-Creatinine Ratio Determination in Dogs ». *American Journal of Veterinary Research* 73, n° 6 (juin 2012): 779-88. <https://doi.org/10.2460/ajvr.73.6.779>.

SCHAEFER, H., Barbara KOHN, Florian J. SCHWEIGERT, et Jens RAILA. « Quantitative and Qualitative Urine Protein Excretion in Dogs with Severe Inflammatory Response Syndrome ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, n° 6 (novembre 2011): 1292-97. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00829.x>.

SCHELLENBERG, Stefan, M. METTLER, Fabio GENTILINI, Reto PORTMANN, Toni M. GLAUS, et Claudia E. REUSCH. « The Effects of Hydrocortisone on Systemic Arterial Blood Pressure and Urinary Protein Excretion in Dogs ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, n° 2 (mars 2008): 273-81. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.0039.x>

SCHULTZE, A.E., et R.K. JENSEN. « Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Canine Urinary Proteins for the Analysis and Differentiation of Tubular and Glomerular Diseases ». *Veterinary Clinical Pathology* 18, n° 4 (décembre 1989): 93-97. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1989.tb00527.x>.

SMETS, Pascale M.Y., Evelyne MEYER, Bert E.J. MADDENS, Luc DUCHATEAU, et Sylvie DAMINET. « Urinary Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney Disease ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, n° 1 (janvier 2010): 65-72. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0426.x>.

THERON, Marie-Laure, Laetitia PIANE, Laetitia LUCARELLI, Rémi HENRION, Catherine LAYSSOL-LAMOUR, Florence PALANCHE, Didier CONCORDET, Jean-Pierre D. BRAUN, Catherine TRUMEL, et Rachel LAVOUE. « Effects of Storage Conditions on Results for Quantitative and Qualitative Evaluation of Proteins in Canine Urine ». *American Journal of Veterinary Research* 78, n° 8 (août 2017): 990-99. <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.8.990>.

VADEN, Shelly L., et Jonathan ELLIOTT. « Management of Proteinuria in Dogs and Cats with Chronic Kidney Disease ». *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 46, n° 6 (novembre 2016): 1115-30. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.06.009>.

VAIL, David M. « Myeloma-Related Disorders ». In *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, Elsevier. 5th Edition. David M Vail, 2012.

VILHENA, Hugo C. R., Raquel R. SANTOS, Teresa J. SARGO, Tatiana B. LIMA, Sofia S. DIAS, M. RAMIRO PASTORINHO, Felisbina L. Queiroga, et Ana C. Silvestre-Ferreira. « Urine Protein-to-Creatinine Concentration Ratio in Samples Collected by Means of Cystocentesis versus Manual Compression in Cats ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 246, n° 8 (15 avril 2015): 862-67. <https://doi.org/10.2460/javma.246.8.862>.

YALÇIN, Abdullah, et Melis S CETIN. « Electrophoretic Separation of Urine Proteins of Healthy Dogs and Dogs with Nephropathy and Detection of Some Urine Proteins of Dogs Using Immunoblotting ». *Revue Médicale Vétérinaire* 155, n° 2 (2004): 104-12.

ZARAGOZA, Concepción, Rafael BARRERA, Francisco CENTENO, Jose A. TAPIA, et María Cinta Mañé. « Canine Pyometra: A Study of the Urinary Proteins by SDS-PAGE and Western Blot ». *Theriogenology* 61, n° 7-8 (mai 2004): 1259-72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.019>.

ZINI, Eric, Ugo BONFANTI, et Andrea ZATELLI. « 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 of Veterinary Research* 65, n° 7 (juillet 2004): 964-71

ANNEXES

ANNEXE 1 : Formulaire de consentement éclairé

	<p>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée¹ Unité de Médecine Interne des Carnivores Domestiques²</p> <p>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><i>Annexe 1</i></p> <p>CONSENTEMENT ECLAIRE</p>
<p>Etude visant à préciser l'influence du mode de collecte des urines sur leur analyse complète chez le chien</p>		

Étude effectuée au sein de l'E.N.V.T. entre le 25 Janvier 2016 et le 30 Mai 2016

L'objectif primaire de cette étude est d'évaluer l'influence du mode de collecte des urines sur leur analyse complète chez le chien.

Les prélèvements urinaires utilisés pour cette étude ne sont réalisés que dans un contexte médical encadré et ont un intérêt immédiat dans l'évaluation de l'état de santé du chien sauf pour les animaux dont les propriétaires sont volontaires. Aucun effet secondaire néfaste n'est à craindre.

Je, soussigné(e),

Propriétaire du chien(s) :

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

N° d'identification (éventuellement)

.....
.....

Atteste avoir lu les paragraphes précédents, avoir été clairement informé du caractère facultatif de cette étude et avoir conscience de ma totale liberté de refuser que mon chien y participe.

Et accepte que mon (mes) chien(s) soi(en)t inclus dans l'étude.

À le
.....

Signature :

ANNEXE 2 : Fiche d'accompagnement de prélèvements

 	<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>Annexe 2</i> FICHE DE RENSEIGNEMENT </p>
<p align="center">Étude visant à préciser l'influence du mode de collecte des urines sur leur analyse complète chez le chien</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 ENVT
 :.....

Date de naissance :..... Sexe :..... Stérilisé : Oui
 Non

Questions Préliminaires :

1. Motif de consultation à l'ENVV (écrire « volontaire » si patient volontaire)

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

2. Motif de réalisation de l'analyse d'urine (écrire « volontaire » si patient volontaire)

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

3. Antécédents connus d'affection du tractus urinaire et/ou de protéinurie?

Oui Non

Si oui, a-t-on des précisions sur les anomalies mises en évidence:

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

4. Hypothèses diagnostiques

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

5. Commentaires :

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

ANNEXE 3 : Fiche d'analyse

 <p>INP ECOLE NATIONALE VÉTÉRAIRE</p>	<p>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée¹ Unité de Médecine Interne des Carnivores Domestiques²</p> <p>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><i>Annexe 3</i></p> <p><i>FICHE ANALYTIQUE</i></p>
<p>Étude visant à préciser l'influence du mode de collecte des urines sur leur analyse complète chez le chien</p>		

Numéro d'Identification pour l'Etude :

.....

1. Informations relatives au prélèvement :

6. Volume total d'urine disponible (ml):

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- c. Par cystocentèse
échoguidée.....

7. Date et Heure de prélèvement des urines :

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- c. Par cystocentèse
échoguidée.....

8. Heure de dépôt des urines au laboratoire :

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- c. Par cystocentèse
échoguidée.....

9. Intervalle < 2 heures respecté entre le prélèvement et l'analyse?

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génital
 Oui Non
- b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale
 Oui Non
- c. Par cystocentèse échoguidée
 Oui Non

Echantillonnage des urines :

1. **Heure de centrifugation :**

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- c. Par cystocentèse
échoguidée.....

2. Heure de rangement à -80°C :

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- c. Par cystocentèse échoguidée.....

3. Remarques / difficultés :

.....
.....

Analyses immédiates :

1. Densité urinaire :

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale.....
- c. Par cystocentèse échoguidée.....

2. Bandelettes urinaires (par imbibition des plages réactives) :

- a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale :

pH :

Densité :

leucocytes		Sang	
nitrites		Cétones	
urobilinogène		Bilirubine	
protéines		glucose	

b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale :

pH :

Densité :

leucocytes		Sang	
nitrites		Cétones	
urobilinogène		Bilirubine	
protéines		glucose	

c. Par cystocentèse échoguidée :

pH :

Densité :

leucocytes		Sang	
nitrites		Cétones	
urobilinogène		Bilirubine	
protéines		glucose	

3. Analyse du sédiment :

a. Par miction naturelle sans nettoyage de la sphère uro-génitale

Éléments comptés	Champ 1	Champ 2	Champ 3	Champ 4	Champ 5	Champ 6	Champ 7	Champ 8	Champ 9	Champ10
Cristaux (x100)										
Hématie (x400)										
Leucocytes (x400)										
Cylindres (x100)										
Bactérie										
Spermatozoïdes										

Conclusions analyse cytologique / Commentaires :

.....

b. Par miction naturelle avec nettoyage de la sphère uro-génitale

Éléments comptés	Champ 1	Champ 2	Champ 3	Champ 4	Champ 5	Champ 6	Champ 7	Champ 8	Champ 9	Champ 10
Cristaux (x100)										
Hématie (x400)										
Leucocytes (x400)										
Cylindres (x100)										
Bactérie										
Spermatozoïdes										

Conclusions analyse cytologique / Commentaires :

.....

c. Par cystocentèse échoguidée :

Éléments comptés	Champ 1	Champ 2	Champ 3	Champ 4	Champ 5	Champ 6	Champ 7	Champ 8	Champ 9	Champ 10
Cristaux (x100)										
Hématie (x400)										
Leucocytes (x400)										
Cylindres (x100)										
Bactérie										
Spermatozoïdes										

Conclusions analyse cytologique / Commentaires :

.....

.....

.....

.....

4. Mesure du RPCU dans les 72h post-congélation à -80°C

	Miction naturelle sans nettoyage	Miction naturelle avec nettoyage	Cystocentèse
Date et heure d'analyse			
Protéinurie (mg/L)			
Créatininurie (mg/L)			
RPCU			

5. Remarques / Difficultés :

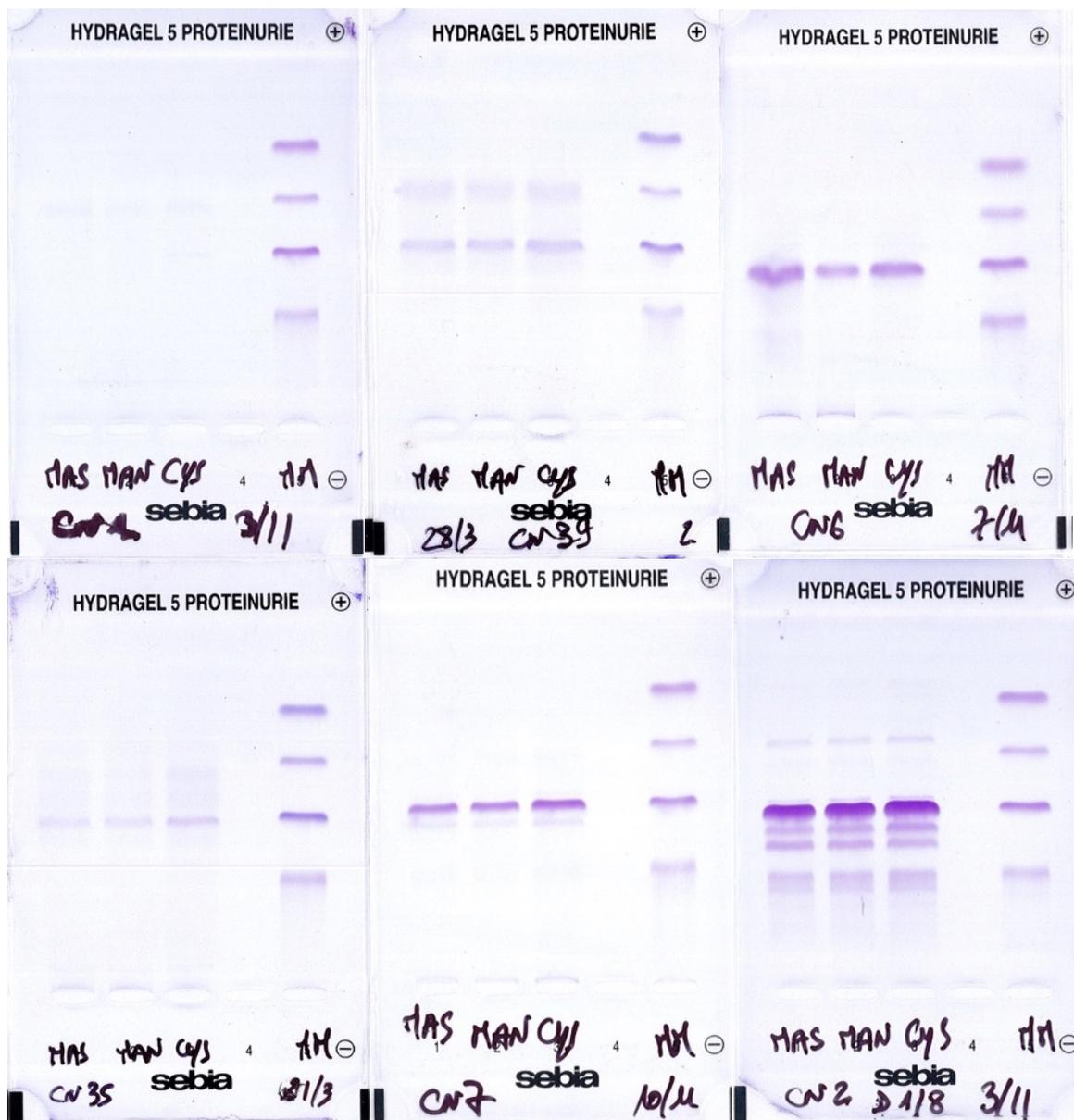
.....
.....
.....

ANNEXE 4 : Extrait du tableur de résultat

n° clovis	n° id	node collect	date de naiss	date de preli	age	sexe	gabarit	DU LP	gluc. LP	bili LP	c c LP	sg LP	pH LP	prot LP	urobili LP	nitrite LP	leuc LP	moy cristaux	moy GR	moy leuc	moy cylindre	moy bact	moy spz	moy cell	epith
16-951*	1	MAS	01/08/2004	18/02/2016	11,58	FS	2	1,026	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16-951*	1	MAN	01/08/2004	18/02/2016	11,58	FS	2	1,022	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16-951*	1	CYS	01/08/2004	18/02/2016	11,58	FS	2	1,021	0	1	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14-6313*	2	MAS	01/01/2004	22/02/2016	12,18	FS	2	1,019	0	0	0	1	6,5	1	0	0	0	0	0,3	0,1	0,4	0	0	1,9	
14-6313*	2	MAN	01/01/2004	22/02/2016	12,18	FS	2	1,021	0	0	0	1	6	1	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	2,5	
14-6313*	2	CYS	01/01/2004	22/02/2016	12,18	FS	2	1,022	0	0	0	1	6	1	0	0	0	0	0	0	0,2	0,1	0	0,3	
16-458*	3	MAS	26/04/2005	24/02/2016	10,86	FS	2	1,006	0	1	0	1	6	1	0	0	1	0	0,1	50	0	100	0	0,1	
16-458*	3	MAN	26/04/2005	24/02/2016	10,86	FS	2	1,007	0	0	0	1	6,5	1	0	0	1	0	0,2	50	0	100	0	0,2	
16-458*	3	CYS	26/04/2005	24/02/2016	10,86	FS	2	1,007	0	0	0	1	7,5	1	0	0	1	0	0,1	50	0	0	0	0,1	
12-6621*	4	MAS	23/05/2010	25/02/2016	5,78	M	2	1,020	0	0	0	1	6	1	0	0	0	0	1,7	50	0,4	0	0	1,6	
12-6621*	4	MAN	23/05/2010	25/02/2016	5,78	M	2	1,021	0	1	0	1	6	1	0	0	0	0	0,6	17,8	0,1	0	0,6	3,8	
12-6621*	4	CYS	23/05/2010	25/02/2016	5,78	M	2	1,021	0	0	0	1	6	1	0	0	0	0	0,8	20,6	0,4	0	0,8	1,6	
16-1466*	5	MAS	29/12/2014	08/03/2016	1,19	F	2	1,008	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	
16-1466*	5	MAN	29/12/2014	08/03/2016	1,19	F	2	1,008	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	
16-1466*	5	CYS	29/12/2014	08/03/2016	1,19	F	2	1,007	0	0	0	0	5,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12-4864*	6	MAS	01/08/2009	09/03/2016	6,62	FS	2	1,043	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,3	
12-4864*	6	MAN	01/08/2009	09/03/2016	6,62	FS	2	1,042	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	
12-4864*	6	CYS	01/08/2009	09/03/2016	6,62	FS	2	1,041	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0,5	
16-1309*	7	MAS	01/02/2007	09/03/2016	9,13	FS	3	1,019	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0,1	0,3	0	0	0,4	
16-1309*	7	MAN	01/02/2007	09/03/2016	9,13	FS	3	1,017	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	
16-1309*	7	CYS	01/02/2007	09/03/2016	9,13	FS	3	1,025	0	0	0	1	6	1	0	0	0	0	0,3	0,1	0,1	0	0	0,3	
16-670*	8	MAS	02/08/2012	10/03/2016	3,61	M	2	1,047	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	14	2,5	0,1	0	0,4	2,2	
16-670*	8	MAN	02/08/2012	10/03/2016	3,61	M	2	1,047	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	2,7	3,8	0,3	0	1,9	3,6	
16-670*	8	CYS	02/08/2012	10/03/2016	3,61	M	2	1,045	0	0	0	0	7	1	0	0	0	0	0,6	2,3	0,2	0	0	3,1	
15-5970*	9	MAS	27/08/2004	15/03/2016	11,58	FS	1	1,013	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0,1	1,4	10	0	0	1,6	
15-5970*	9	MAN	27/08/2004	15/03/2016	11,58	FS	1	1,013	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0,1	0,6	10	0	0	2,4	
15-5970*	9	CYS	27/08/2004	15/03/2016	11,58	FS	1	1,013	0	1	0	0	5	1	0	0	0	0	1,5	0,7	10	0	0	1,7	
12-6357*	10	MAS	25/03/2012	30/03/2016	4,02	F	2	1,035	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	
12-6357*	10	MAN	25/03/2012	30/03/2016	4,02	F	2	1,033	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,2	
12-6357*	10	CYS	25/03/2012	30/03/2016	4,02	F	2	1,034	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	

n° clovis	n° id	node collect	date de naiss	date de preli	age	sexe	gabarit	DU LP	Uprot	RPCU	Bandes EPU	Interprétation	Conclusion											
16-951*	1	MAS	01/08/2004	18/02/2016	11,58	FS	2	1,026	589,8	68	0,11529332	ZERO	Physio											
16-951*	1	MAN	01/08/2004	18/02/2016	11,58	FS	2	1,022	478,1	50	0,10458063	ZERO	Physio											
16-951*	1	CYS	01/08/2004	18/02/2016	11,58	FS	2	1,021	484,1	57	0,11774427	ZERO	Physio	IDEM										
14-6313*	2	MAS	01/01/2004	22/02/2016	12,18	FS	2	1,019	688,7	8228	11,9471468	4 HPM, alb 2, 2 BPM	mixte											
14-6313*	2	MAN	01/01/2004	22/02/2016	12,18	FS	2	1,021	729,7	8665	11,874743	4 HPM, alb 2, 2 BPM	mixte											
14-6313*	2	CYS	01/01/2004	22/02/2016	12,18	FS	2	1,022	780,8	9701	12,4244365	4 HPM, alb 2, 2 BPM	mixte	IDEM										
16-458*	3	MAS	26/04/2005	24/02/2016	10,86	FS	2	1,006	273	43	0,15750916	ZERO	Physio											
16-458*	3	MAN	26/04/2005	24/02/2016	10,86	FS	2	1,007	263,5	81	0,30740038	ZERO	Physio											
16-458*	3	CYS	26/04/2005	24/02/2016	10,86	FS	2	1,007	252,6	61	0,24148852	ZERO	Physio	IDEM										
12-6621*	4	MAS	23/05/2010	25/02/2016	5,78	M	2	1,020	484,7	5425	11,1924902	2 HPM, alb 2, 2 BPM	Mixte											
12-6621*	4	MAN	23/05/2010	25/02/2016	5,78	M	2	1,021	487,7	5424	11,1215911	2 HPM, alb 2, 2 BPM	Mixte											
12-6621*	4	CYS	23/05/2010	25/02/2016	5,78	M	2	1,021	498,4	5436	10,9069021	2 HPM, alb 2, 2 BPM	Mixte	IDEM										
16-1466*	5	MAS	29/12/2014	08/03/2016	1,19	F	2	1,008	220,4	78	0,353902	alb 2	glomérulaire											
16-1466*	5	MAN	29/12/2014	08/03/2016	1,19	F	2	1,008	219,8	78	0,35486806	alb 2	glomérulaire											
16-1466*	5	CYS	29/12/2014	08/03/2016	1,19	F	2	1,007	227,5	112	0,49230769	alb 2	glomérulaire	IDEM										
12-4864*	6	MAS	01/08/2009	09/03/2016	6,62	FS	2	1,043	2052	189	0,09208731	alb 2	glomérulaire											
12-4864*	6	MAN	01/08/2009	09/03/2016	6,62	FS	2	1,042	2023	187	0,09243697	alb 2	glomérulaire											
12-4864*	6	CYS	01/08/2009	09/03/2016	6,62	FS	2	1,041	2175	244	0,11219938	alb 2	glomérulaire	IDEM										
16-1309*	7	MAS	01/02/2007	09/03/2016	9,13	FS	3	1,019	459,4	188	0,40922943	1 HPM, alb 2	glomérulaire											
16-1309*	7	MAN	01/02/2007	09/03/2016	9,13	FS	3	1,017	397,5	153	0,38490566	1 HPM, alb 2	glomérulaire											
16-1309*	7	CYS	01/02/2007	09/03/2016	9,13	FS	3	1,025	513,6	307	0,59774143	1 HPM, alb 2	glomérulaire	IDEM										
16-670*	8	MAS	02/08/2012	10/03/2016	3,61	M	2	1,047	4418	464	0,10502014	alb 1, AE	Physio											
16-670*	8	MAN	02/08/2012	10/03/2016	3,61	M	2	1,047	4430	451	0,10180357	alb 1, AE	Physio											
16-670*	8	CYS	02/08/2012	10/03/2016	3,61	M	2	1,045	4129	492	0,11916007	alb 1, AE	Physio	IDEM										
15-5970*	9	MAS	27/08/2004	15/03/2016	11,58	FS	1	1,013	312,4	2823	9,03649168	2 HPM, alb 2	glomérulaire											
15-5970*	9	MAN	27/08/2004	15/03/2016	11,58	FS	1	1,013	340,9	2930	8,59489586	2 HPM, alb 2	glomérulaire											
15-5970*	9	CYS	27/08/2004	15/03/2016	11,58	FS	1	1,013	345,5	2934	8,49204052	2 HPM, alb 2	glomérulaire	IDEM										
12-6357*	10	MAS	25/03/2012	30/03/2016	4,02	F	2	1,035	2629	123	0,04679119	ZERO	Physio											
12-6357*	10	MAN	25/03/2012	30/03/2016	4,02	F	2	1,033	2373	118	0,0497198	ZERO	Physio											
12-6357*	10	CYS	25/03/2012	30/03/2016	4,02	F	2	1,034	2640	121	0,04583681	ZERO	Physio	IDEM										

ANNEXE 5 : Exemple de gels d'électrophorèse



De gauche à droite, de haut en bas :

- Chien n°1 : Profil exempt de toute bande
- Chien n°39 : Profil physiologique d'un chien mâle entier ; présence de deux bandes de faible intensité à environ 68 kDa et 25 kDa
- Chien n°6 : Profil de type glomérulaire ; présence d'une bande de 68 kDa de forte intensité
- Chien n°35 : Profil de type tubulaire ; présence d'une bande de 68 kDa faiblement marquée et de deux bandes d'environ 20 et 30 kDa
- Chien n°2 : Profil de type mixte ; présence de multiples bandes de masses moléculaires comprises entre 20 et 160 kDa

Etude prospective sur l'influence du mode de collecte des urines sur le profil électrophorétique sur gel d'agarose des protéines urinaires chez le chien

L'électrophorèse des protéines urinaires est une méthode permettant de localiser l'atteinte d'une affection rénale en cas de protéinurie. Cette technique peu invasive et peu coûteuse est une étape intéressante de la démarche diagnostique et permettrait de suivre l'évolution d'affections rénales et l'efficacité de leur prise en charge sans risque majeur pour l'animal. Dans ce travail, un bilan des connaissances actuelles quant aux conditions pré-analytiques nécessaires à la réalisation d'une électrophorèse des protéines urinaires est présenté. Puis, dans un second temps, l'influence de deux alternatives au prélèvement des urines par cystocentèse –mode de collecte de référence chez l'animal de compagnie– sur l'électrophorèse des protéines urinaires sur gel d'agarose est évaluée. Cette étude, menée sur 57 chiens, montre que l'interprétation du profil électrophorétique des protéines urinaires est identique selon que les prélèvements ont été réalisés par cystocentèse ou par miction après nettoyage de la zone uro-génitale, bien que certaines variables semblent pouvoir en influencer la lecture. Ainsi, la collecte des urines pour la réalisation d'électrophorèses de suivi semble pouvoir être réalisée directement par des propriétaires, en limitant le stress et les actes invasifs pour l'animal ainsi que le temps et le coût des examens pour les propriétaires. La prise en compte de données épidémiologiques et biologiques est cependant essentielle à la bonne interprétation des gels, quelle que soit la méthode de prélèvement des urines utilisée.

Mots-clés : Chien, urine, protéines urinaires, électrophorèse sur gel d'agarose, mode de collecte, miction spontanée, miction spontanée après nettoyage, cystocentèse

Prospective study on the influence of the method of urine collection on urine proteins electrophoresis in dogs

Urine protein electrophoresis can be used in veterinary medicine to localize the origin of renal proteinuria. This is a low-invasive and inexpensive technique that can be helpful as a diagnostic tool as well as a way to monitor the evolution of renal disease and the effectiveness of the prescribed therapy. This work first presents a review of the current knowledge about pre-analytical conditions that affect the realization and interpretation of urine protein electrophoresis. Then, in the second part, the influence of urine collection method on urine proteins agarose-based electrophoresis is evaluated. The results of this study, including 57 dogs, shows that electrophoretic patterns of urine proteins do not differ when performed on urine collected by free catch after cleaning urine or by cystocentesis. Few variables were however found to influence the interpretation of the patterns. To conclude, follow-up of proteinuric canine patient on voided urine samples seems reasonable. Samples could be directly collected by owners, thus limiting stress and invasive procedures as well as decreasing costs and time spent at the vet. Some epidemiological and biological variables should however be taken into account to correctly interpret canine urine electrophoretic patterns.

Key words: Dog, urine, urine protein, agarose-based electrophoresis, method of collection, free catch, free catch after cleaning, cystocentesis