



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 11847](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID%3A11847)

**To cite this version :**

Nadaud Carole. *Evaluation d'une nouvelle méthode de mesure du RPCU canin à partir d'urines recueillies sur papier absorbant.*

Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 106 p.

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

# ÉVALUATION D'UNE NOUVELLE MÉTHODE DE MESURE DU RPCU CANIN À PARTIR D'URINES RECUEILLIES SUR PAPIER ABSORBANT

---

THÈSE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

**NADAUD Carole**

Née, le 28 mai 1988 à LIBOURNE (33)

---

**Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL**

---

**JURY**

PRESIDENT :

**Mme Monique COURTADE-SAÏDI**

Professeure à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Catherine TRUMEL**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Mme Nathalie BOURGES-ABELLA**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE





Ministère de l'Agriculture de l' Agroalimentaire et de la Forêt

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

**Directeur** : M. Alain MILON

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*

Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*

Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES ET AGENTS CONTRACTUELS
---

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS
--

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*



## Remerciements

À notre président de jury,

**Madame la Professeure Monique COURTADE-SAÏDI,**

Professeure des Universités,

Praticien hospitalier,

*Service d'Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie,*

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

À notre jury de thèse,

**À Madame la Professeure Catherine Trumel,**

Professeure à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Biologie Médicale Animale et Comparée,*

**À Madame la Professeure Nathalie Bouges-Abella,**

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Histologie, Anatomie pathologique,*





\*\*\*\*

Je tiens à remercier le **Professeur Jean-Pierre Braun** sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour... Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue et encadrée tout au long de ce travail.

Merci aussi au **Docteur Rachel Lavoué** pour m'avoir « mis en selle » sur ce projet.

\*\*\*\*

À **mes parents**, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix (bons et mauvais). Merci de m'avoir permis d'être ce que je suis aujourd'hui. Je vous aime fort.

À mes sœurette **Lysiane** et **Marielle**, plus petites en âge (mais pas en taille JE SAIS). Je tenais à vous dire merci, de nous avoir supporté toutes ces années moi et mes lubies. Sachez que vous me manquez et que je serai toujours là pour vous. Les triplettes de Servanches !

À ma **grand-mère Madeleine**. Voilà 26 ans que nous partageons notre gâteau d'anniversaire et j'espère que cela continuera encore bien longtemps !

À mon **grand-père** maternel **Jean**, aussi gai et fringant qu'à l'âge de 20 ans (c'est ce qu'il se dit). Merci d'être là aujourd'hui.

À la mémoire de mes **grands-parents Henriette et Jean**, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui.

À **mes oncles et tantes** maternelles, Dominique et Sylvie, Jean-Paul et Marivonne, Didier et Isabelle, Nicole et Bruno, Christian et Marie-Joe et à leur progéniture de cousins et cousines, que je revoie avec plaisir même si celui-ci se fait trop rare..

\*\*\*\*

À **Martine et François**, pour tout ce que vous avez pu faire pour moi, pour nous. Merci pour votre écoute... J'espère que vous viendrez nous rendre visite où que l'on atterrisse avec Alexis...

À mes **amis**, pour lesquels j'ai eu si peu de temps cette année : **Katy** l'irréductible, **Amandine**, **Charles** (et **Alix** bien sûr), **Franck** et **Paul**, **Audrey**, **Isabelle**, **Auréline**, **Tiffany**, **Alexandre** (ouais et même que t'es invité au restaurant), **Solène**, **Anne-Lise**, **François**, **Philippe** et tous les autres... Difficile de résumer ces années passées auprès de vous en quelques lignes. Et puisque je n'y arriverai probablement pas (pas sans verser quelques larmes), ce que je vous propose c'est d'en discuter autour d'un verre ! Puisseons-nous ne pas nous perdre de vue maintenant qu'on est tous et toutes grands et DOCTEURS !

À **Élodie**, mon petit coup de cœur de 2013, avec qui j'ai partagé plus que des nuits de garde à Clamart. Tu es une perle (et il n'y a bien que toi qui ne le saches pas). Je te souhaite tout le bonheur possible et imaginable...

À **Delphine** et à nos délires qui ont permis de rendre plus douce la prépa même si ta lubie de me mettre les doigts dans les prises pouvait être (un peu) gênante parfois ☺ !

À **Charlotte** et à tous nos fous rires à l'Internat ou à poney ! Et à toute **la troupe de Barbezieux** : Amandine, Lucie, Adeline, Émeline, Leïla, Flopi et compagnie !

À **Julia**, ma groloc' féminine, merci d'être là, pour tout et pour rien, tout simplement.

À **Maxime**, mon groloc' co-boulet. Merci de m'avoir montré que oui, il existe sur Terre quelqu'un d'aussi tête-en-l'air que moi !

À **Baptiste**, mon groloc' co-labo, cette grosse blaaaaaate, ta zénitude laborantine me manquera.

À **Maud** ma co-labo co-potineuse, la douce ! Je suis ravie d'avoir passé cette année auprès de toi.

Au **labo et à ses occupants** : Laetitia, Cathy, Fanny, Nanou, Florence, Claude et Claire. Merci pour cette année au labo et continuez de choyer les petits comme il se doit !

À **Édouard**, qui m'a permis de voir l'Alforie comme je ne l'avais jamais vue et de découvrir les after andouillettes et j'en passe.

À tous les **Alforiens** qui m'ont permis de passer une année hors du commun, entre CHUVA et Grisby : Magalie et sa morue de chienne, Élisabeth, Hélène, Sophie, Dambrine, Charlotte, M-C, Édouard, Fabing, Martin, La Boob's team : Sophie, Clémence et Julie mais aussi Julien (et sa TOB), Caroline... et toutes celles et ceux que je ne cite pas mais que je n'oublie pas pour autant.

À toute la « **bande** » : Mathieu, Clément, Bastien et Céline mais aussi Xavier, Pauline, Marion, Soaï, Charlotte, Aude... Merci de m'avoir donné la chance d'être un peu plus que « la copine de » (titre fort confortable néanmoins ☺).

À mes **Docs** et à mes **poulots**. À **Adèle** ma co-thésarde dame-pipi. Pour les quelques moments passés avec vous. Désolée de ne pas avoir été plus présente.

À toutes celles et ceux que je n'ai pas cités, mais que je n'oublie pas pour autant. Je suis toujours aussi douée pour les remerciements (ironie)... Mais merci à tous ceux qui ont croisé ma route et m'ont permis de me construire.

Et pour finir : à **Kiss et Cosette**, les deux inséparables qui savent si bien pimenter notre quotidien (un peu trop souvent à mon goût), mais quand on est mignon, on peut tout se permettre.

**À Alexis,**

Qui partage mes joies, mes peines (et surtout me supporte) depuis maintenant plus de 4 ans.

Pour ton amour, ta patience, le réconfort et le soutien que tu as su m'apporter à chaque instant (mais après le café du matin quand même ☺). À tous les merveilleux moments passés ensemble et aux nombreux autres qui nous attendent.

Parce que c'est toi, tout simplement... toi avec qui j'espère passer le reste de ma vie.

Je t'aime.

# TABLE DES MATIÈRES

<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b> .....	<b>16</b>
<b><u>LISTE DES FIGURES</u></b> .....	<b>17</b>
<b><u>LISTE DES TABLEAUX</u></b> .....	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>21</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>22</b>
<b>1. Mesure de l'excrétion protéique urinaire : collecte sur 24 heures et RPCU</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1. La collecte sur 24 heures : la méthode de référence</b> .....	<b>22</b>
1.1.1. Principe de la méthode de collecte des urines sur 24 heures .....	22
1.1.2. Limites de la méthode.....	23
1.1.3. Stratégies pour s'affranchir des limites de la méthode de référence .....	23
<b>1.2. Le rapport protéines sur créatinine urinaires (RPCU) : une alternative</b> .....	<b>24</b>
1.2.1. Introduction du RPCU .....	24
1.2.2. Validation du RPCU .....	26
<b>2. Facteurs de variations pré-analytiques</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1. Liés à l'animal</b> .....	<b>27</b>
2.1.1. Facteurs de variation physiologiques .....	27
2.1.2. Variabilité biologique journalière du RPCU .....	31
2.1.3. Stress et état fébrile.....	33
2.1.4. Médicaments.....	34
2.1.5. Hématurie et inflammation du tractus urinaire .....	35
<b>2.2. Liés à la technique</b> .....	<b>37</b>
2.2.1. Méthode de prélèvement .....	37
2.2.2. Conservation des spécimens : température et délai d'analyse .....	37
<b>3. Facteurs de variations analytiques du RPCU</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1. Les facteurs de variation analytiques non spécifiques</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2. Technique de dosage des protéines urinaires</b> .....	<b>40</b>
3.2.1. Principes des techniques .....	40
3.2.2. Caractéristiques métrologiques.....	40

<b>3.3. Techniques de dosage de la créatinine urinaire .....</b>	<b>46</b>
3.3.1. Principe des techniques .....	46
3.3.2. Caractéristiques métrologiques.....	46
<b>3.4. Critères métrologiques du RPCU .....</b>	<b>49</b>
<b>4. Critères d'interprétation du RPCU .....</b>	<b>52</b>
4.1. Place du RPCU dans le cadre de l'exploration et du suivi d'une protéinurie .....	52
4.2. Intérêt clinique de l'évaluation quantitative de la protéinurie via le RPCU .....	56
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE .....</b>	<b>59</b>
<b>1. Matériel et méthodes .....</b>	<b>59</b>
1.1. Schéma expérimental.....	59
1.2. Les animaux – Critères d'inclusion et d'exclusion .....	60
1.3. Collecte et traitement des spécimens urinaires .....	60
1.4. Etapes pré-analytiques .....	61
1.4.1. Préparation des spécimens sur papier absorbant .....	61
1.4.2. Traitement et conservation des spécimens .....	61
1.5. Etapes analytiques .....	62
1.5.1. Analyses préliminaires des urines .....	62
1.5.2. Technique de détermination de la créatinine et des protéines urinaires .....	63
1.5.3. Calibration de l'analyseur et Contrôle de qualité .....	63
1.6. Protocole expérimental .....	64
1.6.1. Essai préliminaire .....	64
1.6.2. Comparaison des valeurs de RPCU dans une population de chiens sains et de chiens protéinuriques .....	64
1.6.3. Simulation des conditions de prélèvements d'un propriétaire à son domicile .....	65
1.6.4. Répétabilité et reproductibilité .....	65
1.7. Analyse des données.....	65
<b>2. Résultats .....</b>	<b>66</b>
2.1. Essai préliminaire .....	66
2.1.1. Nature et volume de solvants.....	66
2.1.2. Essai préliminaire de stabilité sur 3 jours .....	67
2.2. Comparaison des valeurs de RPCU dans une population de chiens sains et de chiens protéinuriques.....	69
2.3. Simulation des conditions de prélèvements d'un propriétaire à son domicile .....	74
2.4. Erreurs de classification des spécimens sur papier absorbant .....	79
2.5. Répétabilité et reproductibilité .....	83

<b>3. Discussion .....</b>	<b>87</b>
<b>3.1. Validité du protocole expérimental .....</b>	<b>87</b>
<b>3.2. Imprécision de la méthode d'analyse sur papier absorbant .....</b>	<b>87</b>
<b>3.3. Méthodes alternatives à la mesure standard du RPCU .....</b>	<b>89</b>

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>91</b>
-------------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>92</b>
----------------------------	-----------

<b><u>Annexe 1</u> : Imprécision du dosage des protéines urinaires par le rouge de pyrogallol (synthèse bibliographique) .....</b>	<b>101</b>
--	------------

<b><u>Annexe n° 2</u> : Formulaire de consentement éclairé .....</b>	<b>103</b>
--	------------

<b><u>Annexe 3</u> : Réactif rouge de pyrogallol (dosage des protéines urinaires) .....</b>	<b>104</b>
---	------------

<b><u>Annexe 4</u> : Réactif Jaffé (dosage de la créatinine urinaire).....</b>	<b>105</b>
--	------------

<b><u>Annexe 5</u> : Liquichek Urine Chemistry Control niveaux 1 et 2 .....</b>	<b>106</b>
---	------------



## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ANOVA : Analysis of Variance

ASS : acide sulfosalicylique

IECA : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I

IRIS : International Renal Interest Society

LABM : Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale

NAG : N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase

RBP : Retinol Binding Protein

RPCU : rapport protéines sur créatinine urinaires

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir de spécimens papiers analysés avec 2 solvants et 3 volumes différents (Eau 0,5 mL ; Eau 1,0 mL ; Eau 1,5 mL ; NaCl 0,5 mL ; NaCl 1,0 mL ; NaCl 1,5 mL).....	66
<u>Figure 2</u> : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir de spécimens papiers analysés à J1, J2 et J3.....	68
<u>Figure 3</u> : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir des spécimens papiers analysés à J0, J1, J2, J3, J4 et J5. ....	69
<u>Figure 4</u> : Évolution des RPCU obtenus à partir des spécimens papiers à différents moments post-séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5) comparés au RPCU obtenu par la méthode de référence (Liquide) sur 62 animaux.. ....	70
<u>Figures 5 à 10</u> : Régression de Passing-Bablok : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5). ....	72
<u>Figures 11 à 16</u> : Graphiques de Bland-Altman : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5) .....	73
<u>Figure 17</u> : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir de spécimens papiers obtenus par trempage et analysés à J0, J1, J2, J3, J4 et J5. ....	74
<u>Figure 18</u> : Évolution des RPCU obtenus à partir des spécimens papiers obtenus par trempage à différents moments post-séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5) comparés aux valeurs obtenues par la méthode de référence à partir des spécimens liquides (Liquide) sur 25 animaux.....	75
<u>Figures 19 à 24</u> : Régression de Passing-Bablok : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers après trempage, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5).....	77

<u>Figures 25 à 30</u> : Graphiques de Bland-Altman : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers après trempage, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5).....	78
<u>Figure 31</u> : Scatter plot représentant la distribution des n=9 valeurs de RPCU obtenues pour chacun des 30 spécimens à T0.....	84
<u>Figure 32</u> : Scatter plot représentant la distribution des valeurs de RPCU (n=9) obtenues pour chacun des 30 spécimens à T0 avec une restriction d'échelle (permettant de mieux se représenter la variabilité intra-individuelle).....	85
<u>Figure 33</u> : Évolution du RPCU moyen (n=9) des 30 spécimens traités de J0 à J5.....	86

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Erreurs de classification autour du seuil RPCU = 0,2 [71].	50
<u>Tableau 2</u> : Erreurs de classification autour du seuil RPCU = 0,5 [71].	50
<u>Tableau 3</u> : Comparaison des résultats obtenus sur spécimens papiers à J0 (immédiatement après séchage) pour les 2 solvants (eau distillée et NaCl 0,9%) et pour respectivement 3 volumes distincts (0,5 mL, 1,0 mL et 1,5 mL).	67
<u>Tableau 4</u> : Comparaison des résultats obtenus sur spécimens papiers de J0 à J5 à ceux obtenus sur spécimens liquides par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson et l'étude d'agrément selon Passing-Bablok.	71
<u>Tableau 5</u> : Comparaison des résultats obtenus sur spécimens papiers par trempage de J0 à J5 à ceux obtenus sur spécimens liquides par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson et l'étude d'agrément selon Passing-Bablok.	76
<u>Tableau 6</u> : Classification des spécimens à partir des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et sur spécimens papiers de J0 à J5 dans la partie 2 du protocole expérimental.	79
<u>Tableau 7</u> : Classification des spécimens à partir du RPCU obtenu par la méthode de référence (Liquide) et sur spécimen papier obtenus par trempage de J0 à J5 dans la partie 3 du protocole expérimental.	80
<u>Tableau 8</u> : Erreurs de classification des spécimens papiers de J0 à J5 par comparaison avec la valeur de RPCU obtenue par la méthode de référence, dans l'étude de comparaison dans une population de chiens sains et protéinuriques (partie 2 du protocole).	81
<u>Tableau 9</u> : Erreurs de classification des spécimens papiers obtenus par trempage de J0 à J5 par comparaison avec la valeur de RPCU obtenue par la méthode de référence, dans l'étude de simulation des conditions de prélèvement d'un propriétaire à son domicile (partie 3 du protocole).	82
<u>Tableau 10</u> : Imprécision de la mesure RPCU de J0 à J5 via le calcul du coefficient de variation (CV) moyen, médian, minimum (mini) et maximum (maxi).	84



## INTRODUCTION

La protéinurie est définie par la présence d'une quantité anormalement élevée de protéines dans les urines. Sa mise en évidence, sa caractérisation et son suivi sont considérés comme des étapes clés des démarches diagnostique et thérapeutique dans le cadre de maladie rénale ou d'affections systémiques chez le chien pour lesquelles la protéinurie est reconnue comme une complication fréquente.

La méthode de référence de quantification de la protéinurie est la mesure de l'excrétion protéique à partir d'une collecte d'urines sur 24 heures. Pour des raisons pratiques, elle est peu utilisée en médecine vétérinaire où l'on préfère rapport protéines sur créatinine urinaire (RPCU) sur un spécimen d'urines. La mesure et le suivi du RPCU nécessitent souvent une consultation chez le vétérinaire puis un envoi à un laboratoire extérieur, ce qui peut être compliqué d'un point de vue logistique et coûteux pour un éleveur canin. Il pourrait donc être intéressant, surtout pour les éleveurs de races à risques de néphropathies, de disposer d'une méthode alternative de mesure du RPCU permettant un suivi aisé.

C'est en ce sens qu'une méthode alternative de mesure du RPCU a été pensée et développée à partir d'urines prélevées puis déposées sur du papier absorbant. Le propriétaire peut ainsi, sur le conseil de son vétérinaire, collecter lui-même et envoyer directement au laboratoire sans précaution particulière.

L'objectif de cette thèse a été de réaliser une première évaluation de cette méthode de mesure du RPCU sur papier absorbant en la comparant à la méthode habituelle dans des conditions standardisées de préparation des spécimens papiers dans un premier temps, puis en se rapprochant des conditions auxquelles un propriétaire pourrait être confronté sur le terrain. Après un bref rappel sur le RPCU, le protocole expérimental utilisé et les résultats obtenus seront rapportés. Ils seront ensuite discutés pour en envisager l'exploitation pratique.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **1. Mesure de l'excrétion protéique urinaire : collecte sur 24 heures et RPCU**

#### 1.1. La collecte sur 24 heures : la méthode de référence

L'excrétion protéique urinaire étant variable selon la concentration/dilution des urines au cours de la journée, il est préférable de se référer à l'excrétion totale de protéines pendant 24 heures.

La mesure de cette excrétion, réalisée sur une collecte d'urines pendant 24 heures, est reconnue comme la méthode « standard » la plus fiable pour quantifier la protéinurie [1,2]. Elle présente des avantages indéniables pour l'interprétation puisqu'elle minimise la variabilité des résultats obtenus, comparée à l'analyse d'un prélèvement ponctuel ou sur des périodes de collecte plus courtes. De plus, des données supplémentaires comme la clairance de la créatinine endogène peuvent être obtenues si la créatininémie est mesurée simultanément [1].

##### 1.1.1. Principe de la méthode de collecte des urines sur 24 heures

Le principe de cette méthode est décrit ci-dessous [3] :

- Au début de la collecte, la vessie de l'animal est vidée par cystocentèse ou sondage voire par miction spontanée, avec un contrôle échographique de la vacuité vésicale.
- L'animal est ensuite placé dans une cage à métabolisme pendant 24 heures permettant la récolte de la totalité de l'urine émise par l'animal sur cette période.
- Au bout de 24 heures, la vessie est à nouveau vidée et l'urine recueillie est ajoutée à l'urine récupérée grâce à la cage à métabolisme pendant les heures précédentes.

La totalité du volume d'urine prélevé sur 24 heures est donc mesurée, homogénéisée et divisée en aliquotes sur lesquelles sont réalisées les analyses. La quantité totale de protéines urinaires éliminées en 24 heures est ainsi obtenue en multipliant le volume urinaire produit sur 24 heures par la concentration en protéines de l'aliquote analysée.

### 1.1.2. Limites de la méthode

Toutefois, cette méthode présente des inconvénients en termes de réalisation mais aussi d'interprétation des valeurs obtenues.

En effet, la procédure de détermination de la clairance urinaire d'un analyte via une cage à métabolisme présente plusieurs points critiques, notamment le rinçage de la cage censé optimiser la quantité de substance récupérée (ce qui est couramment fait pour les études médicamenteuses). En effet, une étude a démontré qu'un rinçage mal réalisé peut sous-estimer jusqu'à 45% la clairance urinaire de la créatinine chez un chien sain (à un dosage de 40 mg/kg). De plus, lorsque la cage est rincée ou non, la quantité de créatinine retrouvée dans les urines est augmentée de 23% ( $p < 0,05$ ), 8% ( $p < 0,05$ ) et 17% ( $p = 0,05$ ) à 40, 80 et 160 mg/kg respectivement [4].

En outre, le stress généré par l'hospitalisation de 24 heures sans sortie possible, l'aspect chronophage et le coût de mise en œuvre de cette méthode (achat de la cage à métabolisme, le personnel) sont autant d'arguments qui font que cette méthode est relativement inaccessible en pratique courante.

De plus, les valeurs physiologiques chez le chien de l'excrétion protéique urinaire sur 24 heures sont très variables selon les méthodes analytiques employées et les études :

- Estimée avec la méthode au bleu de Coomassie à 7,0 ( $\pm 4,9$ ) mg/kg/24h [5], 7,6 ( $\pm 5,47$ ) mg/kg/24h [6], 2,3 ( $\pm 1,0$ ) mg/kg/24h [7], 48 ( $\pm 68,4$ ) mg/kg/24h chez des chiens âgés de 6 à 9 ans et 6 ( $\pm 1,9$ ) mg/kg/24h chez des chiens âgés d'environ 2 mois [8], 5 ( $\pm 2,2$ ) mg/kg/24h [9].
- Estimée avec la méthode au rouge Ponceau à 3,8 ( $\pm 4,1$ ) mg/kg/24h [5], 6,6 mg/kg/24h [10], 4,8 mg/kg/24h [11].

Finalement, chez le chien sain, on considère que la concentration en protéines urinaires est voisine de 0,1 g/L et que la quantité totale éliminée est inférieure à 20 mg/kg/j [12].

### 1.1.3. Stratégies pour s'affranchir des limites de la méthode de référence

Cette méthode n'étant pas concrètement réalisable en routine, certains auteurs ont suggéré des périodes de collecte des urines plus courtes. Le résultat de la concentration en protéines urinaires mesurée sur ce spécimen, une fois multiplié par le débit urinaire (en mL/min) permet d'obtenir un résultat d'excrétion protéique dans les urines exprimé en mg/min qu'il



suffit de traduire ensuite sur 24 heures. Une étude d'Epstein et al. [13], a ainsi trouvé une excrétion protéique d'environ 38,4 mg/kg/24h (sur 26 chiens de gabarit moyen au repos). Cependant, cette étude a aussi démontré une grande variation de ces valeurs selon l'activité de l'animal (repos ou exercice). Une durée de collecte plus courte a aussi été évoquée en biologie humaine, mais les variations de l'excrétion protéique quotidienne chez l'homme allant de 100 à 500%, cette proposition n'a pas été retenue [14].

Ainsi, face aux difficultés pratiques de mise en œuvre de la quantification de la protéinurie sur 24 heures et de la variabilité de l'excrétion protéique au cours de la journée, d'autres méthodes ont été développées avec pour objectif de s'affranchir de la concentration/dilution de l'urine afin d'avoir une estimation fiable de la protéinurie totale sur 24 heures.

## 1.2. Le rapport protéines sur créatinine urinaires (RPCU) : une alternative

### 1.2.1. Introduction du RPCU

En pratique, les variations de concentration/dilution de l'urine sont telles que pour interpréter la concentration en protéines urinaires, la concentration mesurée sur une urine ponctuelle doit être corrigée.

L'osmolarité est considérée comme le critère de référence de la concentration/dilution de l'urine [15]. Elle représente la concentration en particules ayant une activité osmotique par volume de solution et s'exprime en milliosmole par litre (mOsm/L) [15]. Cette valeur ne dépend que du nombre de ces particules en solutions, sans être influencée par la taille, la forme, la masse moléculaire ou la charge de celles-ci [15]. Cependant, elle n'est pas mesurée en routine. Notons qu'en biologie médicale, les termes osmolarité et osmolalité peuvent être utilisés indifféremment car leurs valeurs sont pratiquement égales dans l'urine et le plasma (ces dernières diffèrent de moins de 1% [16]).

D'autres facteurs de correction de la concentration/dilution des urines ont alors été envisagés :

1/ La densité urinaire :

Elle est essentielle sur le plan analytique pour interpréter la concentration urinaire en protéines car elle rend compte de l'aptitude du rein à concentrer ou à diluer l'urine. De plus,

elle présente de nombreux avantages analytiques, mais aussi en terme de praticité qui font d'elle un excellent candidat en tant que facteur de correction de la concentration/dilution de l'urine. En effet, la mesure de la densité urinaire est simple, accessible, peu onéreuse et surtout elle permet une bonne estimation de la concentration urinaire. Plusieurs études ont montré une étroite corrélation entre la densité urinaire mesurée par réfractométrie et l'osmolarité avec une valeur de  $r$  égale à 0,99 [17] ou encore à 0,92 [18].

2/ La concentration en créatinine urinaire :

Malgré tout, c'est la concentration en créatinine urinaire qui est utilisée comme facteur de correction de la concentration/dilution de l'urine. En effet, on estime que l'élimination de la créatinine par le rein est à peu près constante en raison de la stabilité de sa concentration plasmatique, et donc que la créatininurie est une fonction inverse de la concentration urinaire. C'est pourquoi la concentration urinaire en protéines rapportée à la concentration urinaire en créatinine, définissant ainsi le ratio U-Protéines/U-Créatinine, autrement dit le RPCU, permet d'avoir une estimation relativement fiable de la protéinurie [19]. Ce principe est utilisé pour bien d'autres analytes, via le ratio U-Analyte/U-Créatinine [19].

○ Origine de la créatinine urinaire :

L'apport alimentaire de la créatinine est très faible chez le chien. En effet, dans l'alimentation industrielle animale les concentrations en créatine sont faibles, de l'ordre de 0,5 à 2,0  $\mu\text{mol/g}$  [20]. La créatinine résulte principalement de la dégradation de la créatine et de la créatine phosphate musculaires, via une réaction qui est spontanée, irréversible, non-enzymatique, réalisée au sein des myocytes. La conversion de la créatine en créatinine est constante chez l'individu sain et consomme quotidiennement environ 2% de la créatine totale de l'organisme d'après une estimation de biologie humaine. La créatinine libérée par le muscle est ensuite équitablement répartie entre le plasma et les cellules circulantes en tenant compte de leur contenu respectif en eau. Elle est également présente dans la salive, la bile, le liquide céphalo-rachidien... La créatinine, petite molécule non liée aux protéines, est un déchet éliminé par les reins.

○ Elimination urinaire de la créatinine :

La quantité de créatinine excrétée dans l'urine est supposée constante dans le temps pour un individu donné pour trois raisons majeures :

1/ Elle est librement filtrée par le glomérule. Par conséquent, sa concentration dans le filtrat glomérulaire est égale à sa concentration plasmatique [1].

2/ Chez le chien, les tubules proximaux sécrètent de la créatinine activement mais en quantité considérée comme négligeable [21–23], non réabsorbée par le tubule rénal.

3/ La synthèse de créatinine ne dépend que de la masse musculaire [6,24]. Une équation a été proposée pour en tenir compte, mais n'a pas été validée : limite supérieure de P-Créatinine chez le chien (en  $\mu\text{mol/L}$ ) =  $55 + (1,2 \times \text{poids (en kg)})$  [25].

C'est pourquoi l'apport de créatinine au plasma est constant donc que la créatininémie est approximativement stable, excepté en phase post-prandiale [4,26] (cf § 2.1.1.4.). Par conséquent, la quantité éliminée par voie urinaire serait pratiquement constante dans le temps. Ceci est cependant discutable [24].

Ainsi, les habitudes des biologistes et vétérinaires les portent à utiliser la créatinine urinaire en routine comme facteur de correction de la concentration/dilution de l'urine, bien que la mesure de la créatininurie ne soit pas évidente en routine [27] et que l'excrétion urinaire en créatinine sur 24 heures fasse l'objet de variations aussi bien chez l'homme [28] que chez le chien [29] en fonction des techniques de mesure, de la masse musculaire, de l'exercice physique... alors susceptibles d'affecter le rapport protéines urinaires sur créatinine urinaire.

### 1.2.2. Validation du RPCU

L'utilisation du RPCU est largement répandue puisqu'il a été établi qu'une mesure du RPCU à partir d'un spécimen prélevé au hasard sur la journée est bien corrélée à la production protéique urinaire journalière chez le chien [6,11,19,30]. Dans la plupart de ces études, le coefficient de corrélation a été supérieur à 0,95 [6,11,19].

A partir de ces études, il a d'abord été décidé qu'un RPCU chez le chien inférieur à 0,5 est « normal » ; un RPCU compris entre 0,5 et 1 est considéré comme douteux et un RPCU

supérieur à 1 est anormal [12]. Depuis, ces valeurs ont été revues par l'International Renal Interest Society [31], considérant qu'un chien est :

- Non protéinurique si la valeur de son RPCU est strictement inférieure à 0,2.
- Douteux pour toute valeur de RPCU comprise entre 0,2 et 0,5.
- Protéinurique si la valeur de son RPCU est supérieure ou égale à 0,5.

## 2. Facteurs de variations pré-analytiques

La fiabilité du RPCU est fondée sur le postulat que ce test est précis et non influencé par des facteurs pré-analytiques liés à l'animal (comme l'âge, le sexe ou encore le stress) ou liés à la technique (comme le mode de prélèvement) ou encore par des facteurs analytiques. En effet, cette analyse étant fréquemment envoyée dans un laboratoire extérieur, le RPCU est supposé stable au cours du temps et aux différentes températures auxquelles le spécimen pourrait être confronté lors de cet envoi.

### 2.1. Liés à l'animal

#### 2.1.1. Facteurs de variation physiologiques

##### 2.1.1.1. *Le sexe*

Plusieurs études rapportent que chez le chien, il n'existe pas de différence significative de la concentration en protéines urinaires en fonction du sexe, si le prélèvement est effectué par sondage ou cystocentèse. Cependant, l'excrétion protéique urinaire est supérieure chez le mâle si le prélèvement est effectué par miction [5]. Certaines études rapportent que l'excrétion protéique urinaire et la créatininurie « normales » sont supérieures chez les mâles que chez les femelles [2,7], ce qui pourrait donc influencer les valeurs seuil du RPCU définissant les gammes de protéinuries considérées comme physiologiques ou non.

On peut aussi distinguer mâles entiers et mâles castrés en ce qui concerne la protéinurie. En effet, il a été démontré chez l'homme que la contamination par le sperme interfère avec la mesure de la protéinurie, évaluée de manière semi-quantitative par bandelette urinaire [32]. Un rapport sexuel induit une protéinurie à la lecture de bandelette urinaire chez l'homme (mais pas chez la femme), c'est pourquoi il est généralement conseillé d'éviter d'avoir un

rapport sexuel dans les 12 heures précédant une analyse d'urine. De plus, il est admis que ce sont les urines prélevées en tout début de miction, au réveil, qui présentent les concentrations protéiques modifiées, chez des hommes ayant eu un rapport sexuel la veille au soir [33].

Une unique étude chez le chien s'est attachée à évaluer l'influence de la contamination des urines par le sperme sur la mesure de la protéinurie [34]. D'après les résultats de cette étude, la plage « protéines » des bandelettes urinaires est positivée en présence de sperme ou de liquide séminal (dénué de spermatozoïdes) ainsi que la plage « sang », et cela en l'absence d'hématurie microscopique.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la positivité de la plage protéines, notamment une alcalinisation du pH des urines, classiquement responsable de faux-positifs chez le chien. Mais le pH tend plutôt à s'acidifier dans notre cas. De plus, aucun lien évident n'a été mis en évidence entre protéinurie et la présence de spermatozoïdes dans les urines puisque le liquide séminal positive aussi la plage protéines de la bandelette. C'est pourquoi, en l'absence de méthode discriminative permettant de mettre en évidence une contamination par du liquide séminal, il est difficile d'interpréter une légère protéinurie chez un chien mâle entier asymptomatique. Notons que certains médicaments peuvent jouer sur la présence de spermatozoïdes dans les urines en modulant une éjaculation rétrograde (ou rétro-éjaculation), soit en la favorisant (xylazine) [35], soit en la prévenant (phénylpropanolamine) [36].

Une autre modification de la bandelette urinaire est rapportée : la plage « sang » est positivée par une contamination par du sperme et/ou du liquide séminal en l'absence d'hématurie microscopique. Bien que cela n'ait pas été démontré chez le chien, on peut raisonnablement supposer que cela est lié à la présence d'une enzyme peroxydase prostatique (parallèle avec la catalase peroxydase mise en évidence dans le liquide séminal du cheval [37] et la glutathion peroxydase chez l'homme [38]) et du cytochrome B (contenu dans les spermatozoïdes et présentant un groupe hème) [39].

Cette découverte est confortée par la présence d'une protéine d'origine prostatique, spécifique au chien mâle entier, identifiée fortuitement par électrophorèse au cours d'une étude portant entre autres sur la caractérisation quantitative et qualitative de la protéinurie induite par une administration d'hydrocortisone chez des chiens mâles et femelles non stérilisés. Il pourrait s'agir de l'arginine estérase, une protéine sécrétée par la prostate, retrouvée dans l'urine vésicale suite à un reflux à partir de l'urètre proximal [40].

#### 2.1.1.2. *L'âge*

Pour certains auteurs, l'âge ne serait pas un facteur de variation significatif. Cependant, chez le chiot de 2 mois, il semblerait que l'excrétion protéique urinaire quotidienne soit inférieure à l'excrétion protéique en 24 heures d'un adulte. Cependant, la variation inter-individuelle est moins importante chez le chiot (24%) que chez l'adulte (35%) [8]. Une étude portant sur des chiots de 9 à 27 semaines a montré une baisse progressive de la clairance de la créatinine et de la protéinurie avec l'âge, les plus fortes valeurs étant observées à l'âge moyen de 9 semaines [9].

#### 2.1.1.3. *Le poids*

L'existence d'une corrélation entre la concentration protéique urinaire et la masse corporelle n'est pas admise par tous les auteurs. Pour certains, la protéinurie et la créatininurie varient de façon linéaire en fonction du poids de l'animal. L'effet de ce facteur de variation devrait donc s'annuler lors de la mesure du RPCU [3,7].

Quelques auteurs ont étudié l'impact de l'obésité sur la protéinurie chez le chien, les patients humains étant à plus à risques de développer une protéinurie ou une maladie rénale chronique (indépendamment de la présence concomitante d'un diabète sucré ou d'une hypertension chez ces patients-là). En effet, chez des chiens présentant une obésité induite expérimentalement, a été observé le développement de lésions glomérulaires similaires à celles rapportées chez des patients humaines atteints de glomérulopathies liées à l'obésité (dilatation de la capsule de Bowman, épaissement de la membrane basale et prolifération de la matrice mésangiale) [41]. Une récente étude rétrospective a évalué l'effet de la perte de poids sur des biomarqueurs de la fonction rénale de chiens obèses, notamment le RPCU [42]. Cette étude a identifié une diminution significative du RPCU après la perte de poids ( $p = 0,032$ ). Cependant, une autre étude n'a quant à elle pas mis en évidence de différence significative du RPCU entre des chiens en bonne condition et des chiens en surpoids à obèses [43].

#### 2.1.1.4. *Le repas*

Des modifications de la concentration urinaire en créatinine chez le chien ont été rapportées dans des conditions physiologiques : celle-ci augmente d'environ 20 à 25% après la prise alimentaire [24]. D'après une étude plus ancienne chez le chien, la clairance urinaire de la

créatinine augmente d'environ 40% 2 à 4 heures après le repas [44]. Cela va dans le sens de ce qui a été démontré pour la créatinine plasmatique. Celle-ci augmente les premières heures suivant l'ingestion d'un repas à base de viande (crue ou cuite) et reste élevée jusqu'à 12 heures après le repas [45,46].

De plus, les variations inter-individuelles sont très importantes, même pour des urines collectées sur 24 heures. La quantité totale de créatinine urinaire excrétée diffère énormément selon les études (de 170 à 425  $\mu\text{mol/kg/j}$ ) et ces différences peuvent être expliquées par la composition de l'aliment (avec une excrétion urinaire en créatinine majorée en cas de repas à base de viande) mais aussi par l'imprécision de la méthode de dosage [26].

#### 2.1.1.5. *L'exercice physique*

Il a été démontré que les hommes pratiquant une activité physique importante ont une excrétion urinaire en créatinine supérieure à celle des personnes ne pratiquant pas d'activité physique [47,48]. La protéinurie après un effort physique a été rapportée dès 1878, après l'examen d'urines de soldats après une longue marche. Depuis, les publications à ce sujet se sont multipliées chez l'homme. Il s'agit d'un phénomène transitoire de plusieurs heures, autrement appelée la « pseudo-néphrite athlétique », qui n'est ni pathologique ni associé à des effets néfastes sur les reins.

La protéinurie liée à l'exercice pourrait évoquer celle consécutive à l'administration de catécholamines. Elle est attribuée à une diminution du débit de filtration glomérulaire lors d'un exercice physique intense chez l'homme. En médecine humaine, plusieurs hypothèses de mécanismes physiopathologiques ont été avancées pour expliquer cette observation :

- Une augmentation de la quantité de protéines filtrées et/ou une diminution de la réabsorption tubulaire de ces protéines normalement filtrées [49]. Cependant, l'excrétion de glucose et d'acides aminés n'étant pas modifiée après l'exercice, cette hypothèse reste peu probable.
- Des modifications hémodynamiques rénales, impliquant une vasoconstriction rénale par l'activation du système sympathique ont été suggérées comme étant la principale cause de protéinurie chez l'homme [49–51], hypothèse confortée par l'observation d'une protéinurie consécutive à l'administration d'adrénaline.

Chez le chien, le mécanisme responsable de la protéinurie liée à l'exercice n'est pas encore élucidé. Il a été prouvé que, contrairement à l'homme, le débit de filtration glomérulaire restait constant lors d'un exercice physique intense [52]. Une simple augmentation de la perméabilité glomérulaire sans altération pathologique de la barrière glomérulaire à proprement parler a été envisagée comme mécanisme responsable de la protéinurie observée post-exercice, celle-ci étant composée essentiellement d'albumine [13,49].

Néanmoins, une étude chez le chien n'a pas mis en évidence de variation du RPCU après un exercice physique, comparativement à des chiens au repos [6]. Et cette même étude n'a pas établi d'influence de l'heure de collecte sur le RPCU. Une autre étude a démontré que 85 % des chiens (22/36) ne présentaient pas de microalbuminurie après un effort physique (léger et modéré) [53].

Ainsi, une protéinurie mesurée via un RPCU sur des urines prélevées après l'effort ne peut être attribuée avec certitude à l'évolution d'une maladie rénale, sans pouvoir exclure pour autant une véritable protéinurie rénale pathologique. Il est donc recommandé dans ce cas de renouveler l'analyse d'urine sur l'animal au repos cette fois.

#### 2.1.2. Variabilité biologique journalière du RPCU

Les données manquent concernant la variabilité biologique du RPCU chez le chien.

Une étude en médecine humaine a démontré que le RPCU présente le moins de variabilité journalière s'il est mesuré sur un échantillon d'urine prélevé tôt le matin plutôt qu'au coucher [54]. Cependant, aucune étude de ce genre n'a été réalisée en médecine canine.

Une seule étude de Nabity et al. s'est attachée à estimer la variabilité biologique du RPCU chez des chiens femelles hétérozygotes porteuses de la néphropathie liée au chromosome X, et dont la protéinurie était significativement stable jour après jour, semaine après semaine et mois après mois [55]. Ainsi, les variations du RPCU ne pouvaient être attribuées qu'à l'unique variabilité biologique de cette variable ou à l'effet des traitements administrés. Or les conséquences de ces derniers ont été relativement bien étudiés et sont connus [56,57].



Ceci a permis d'en déduire le nombre de mesures répétées nécessaires afin d'obtenir une estimation fiable du RPCU.

En médecine humaine, on considère que 5 spécimens en moyenne sont nécessaires pour s'affranchir des variations biologiques du RPCU, sans préciser si ce nombre diffère selon la valeur de la densité urinaire [58].

Dans l'étude précédente, pour un RPCU inférieur à 4, l'estimation donnée sur une analyse unique d'un spécimen à un instant t est très fiable [55]. Un suivi est malgré tout fortement conseillé face à un RPCU proche des seuils décisionnels (0,2 et 0,5).

Pour des valeurs de RPCU supérieures à 8, tout comme l'étude de Gibb et al. [58], 4 à 5 mesures seraient nécessaires pour obtenir une valeur fiable [55,58]. Mais cela paraît difficile à mettre en pratique car trop chronophage, coûteux en main d'oeuvre et financièrement pour le propriétaire.

Pour des valeurs de RPCU comprises entre 4 et 8, répéter la mesure sur 2 à 3 échantillons distincts permettrait d'améliorer largement la précision de l'estimation, quitte à mélanger ces échantillons (prélevés sur une période de 3 jours minimum) [55].

Plusieurs stratégies d'échantillonnage ont été envisagées pour s'affranchir de la variabilité du RPCU. Nous avons déjà évoqué une estimation du RPCU par la moyenne de mesures répétées de spécimens du même animal. En toute logique, on pourrait aussi procéder à une analyse du mélange équivalent de ces spécimens. Une étude a ainsi comparé la valeur du RPCU obtenue à partir de ces deux protocoles pour 3 spécimens d'urines du même chien [59]. Une importante corrélation ( $r = 0.9998$ ,  $P < 0.0001$ ) a été mise en évidence entre ces deux méthodes d'échantillonnage. Cependant, la méthode d'analyse sur mélange n'a pas pu être validée pour des spécimens dont les valeurs de RPCU étaient supérieures à 8, par manque d'échantillons.

Il s'est aussi avéré que le RPCU évalué sur mélange varie au plus de  $\pm 20\%$  par rapport à la moyenne des RPCU obtenus sur chacun des spécimens. Dans bien des situations cette différence ne serait pas perçue comme cliniquement pertinente. En effet, quand il s'agit par exemple d'évaluer la réponse au traitement ou bien la progression de la maladie, on considère qu'il faut une variation d'au moins 40% de la valeur basale de référence pour conclure à une

modification significative de la protéinurie (et donc pertinente cliniquement) [31]. Cependant, dans les cas de protéinuries douteuses (pour des valeurs de RPCU comprises entre 0,2 et 0,5), une variation de 20% de la valeur du RPCU peut théoriquement devenir significative cliniquement [31]. Le RPCU pourrait par exemple être sous-estimé, sa valeur étant alors comprise dans l'intervalle de référence physiologique et mener ainsi à des faux-négatifs et des erreurs diagnostiques voire thérapeutiques.

Il faut aussi souligner que cette méthode d'échantillonnage ne peut s'appliquer qu'à des animaux dont la protéinurie est chronique et stable et non pas à des animaux dont la protéinurie est susceptible de changer de jour en jour. Dans ce dernier cas, utiliser cette méthode impliquerait la perte d'informations primordiales pour le clinicien concernant l'évolution de la maladie et son pronostic.

Ainsi, le RPCU mesuré à partir d'un mélange équivalent de spécimens issus d'un même chien est une alternative de mesure fiable et plus intéressante d'un point de vue financier pour le propriétaire, plutôt que de répéter séparément l'analyse à partir de plusieurs spécimens distincts. Il faut aussi préciser que dans cette étude la durée moyenne de temps écoulé entre le premier et le dernier prélèvement d'urine était de 48 heures, et que chaque spécimen était analysé dans les 48 heures suivant le prélèvement et conservés à 4°C [59].

Enfin, quand les mesures de RPCU sont multipliées sur un même animal, il est conseillé de prendre des mesures visant à limiter au maximum les facteurs pouvant influencer la variabilité du RPCU :

- Effectuer des prélèvements au même moment de la journée à jeun et pas après un effort physique.
- Avoir recours au même mode de prélèvement à chaque fois.
- Analyser systématiquement chaque spécimen immédiatement après le prélèvement.
- Envoyer l'analyse au même laboratoire utilisant toujours la même machine et le même protocole de mesure.

### 2.1.3. Stress et état fébrile

Un état de stress induit notamment une production de glucocorticoïdes par les surrénales. Il est possible qu'en augmentant le débit de filtration glomérulaire, les glucocorticoïdes soient

responsables d'une hyperfiltration glomérulaire pouvant induire une légère protéinurie qui ne serait que transitoire, réversible, sans lésions associées à proprement parler. Cependant, cela n'a pour le moment pas été démontré chez le chien.

De la même façon, on peut observer lors de fièvre une protéinurie légère et transitoire, secondaire à une vasodilatation glomérulaire, normalisée dès que l'hyperthermie est jugulée.

#### 2.1.4. Médicaments

##### 2.1.4.1. *Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine*

Chez les chiens souffrant d'insuffisance rénale chronique, les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I (IECA) permettent une diminution de la protéinurie significative (RPCU diminué de 4,2 +/- 1,4 au sein du groupe atteint d'IRC après 6 mois de traitement alors qu'il était augmenté de 1,9 +/- 0,9 avec le placebo) associé à un ralentissement de la progression de la maladie et une augmentation de la durée de vie [57].

Ainsi, il est admis que la gestion de la protéinurie chez les chiens et les chats souffrant de maladie rénale chronique débute avec un régime dit « rénal » (limitant l'apport protéique tout en privilégiant des protéines de bonne qualité nutritionnelle, associé au besoin à un chélateur de phosphates) et l'administration d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine avec pour objectif de diminuer au moins de moitié le RPCU ou idéalement de le normaliser à terme [60].

##### 2.1.4.2. *Corticoïdes*

L'incidence de la protéinurie (quantifiée par l'évaluation du RPCU) chez des chiens présentant un syndrome de Cushing (hypercorticisme endogène) est de 44 à 75% selon les études. Une albuminurie a été identifiée aussi bien chez l'homme que chez le chien ou des rats à qui l'on administrait des glucocorticoïdes [61,62]. Un état d'hypercortisolémie prolongé a plusieurs effets systémiques chez le chien : hypertension et protéinurie entre autres [40,63,64]. Cependant, l'augmentation du RPCU chez la plupart des chiens recevant des corticoïdes est légère comparée à celle rapportée chez les chiens souffrant d'hypercorticisme [63].

Les corticoïdes induisent dans un premier temps une augmentation du débit de filtration glomérulaire. Si la prise de corticoïdes est suffisamment longue, elle peut induire des lésions rénales mises en évidence à l'histologie (prolifération de cellules mésangiales, adhésion des

podocytes, épaissement de la capsule de Bowman...) pouvant expliquer la protéinurie observée [64].

De plus, l'hypertension et les modifications hémodynamiques rénales liées à la corticothérapie sont susceptibles de contribuer à la protéinurie observée [40,65]. En effet, une corrélation positive a été démontrée entre l'augmentation de la pression artérielle systémique et la sévérité de la protéinurie chez des chiens souffrant d'un syndrome de Cushing iatrogène induit par l'administration d'hydrocortisone [40,63].

Hypertension et protéinurie (RPCU strictement supérieur à 0,5) sont réversibles et restaurées au bout de 1 mois après l'arrêt du traitement chez des chiens sains [40].

#### 2.1.5. Hématurie et inflammation du tractus urinaire

L'inflammation du tractus urinaire et l'hématurie sont considérées comme des causes classiques de protéinuries chez le chien. Le paragraphe qui suit s'appuie essentiellement sur deux études [66,67].

Dans l'étude de Bagley et al [66], l'inflammation et l'hématurie ont été induites expérimentalement sur 11 chiens Beagle sains (présentant un RPCU basal inférieur à 0,4) par cystotomie. Les deux premiers jours post-opératoires, une augmentation significative du RPCU par rapport aux valeurs pré-opératoires est notée ( $p < 0,05$ ), avec des valeurs comprises entre 0,1 et 1,9.

Dans cette même étude, une cystite bactérienne a été induite expérimentalement sur 5 autres chiens Beagle sains (souche d'Escherichia Coli) induisant une bactériurie, une leucocyturie et une hématurie macroscopique. Chez ces chiens, les RPCU 3 à 4 jours après l'induction expérimentale de l'Infection du Tractus Urinaire (ITU) étaient significativement augmentés ( $p < 0,05$ ), avec des valeurs comprises entre 1,5 et 40,8.

L'étude de Vaden S. et al. présente des résultats contradictoires [67]. En effet, 81% (57/70) des spécimens d'urines canines avec leucocyturie présentaient des valeurs de RPCU n'excédant pas la valeur de 0,4 donc comprises dans l'intervalle de référence physiologique. Par ailleurs, il n'a pas été mise en évidence de corrélation entre le degré de leucocyturie et la valeur du RPCU, ce qui concorde avec les résultats obtenus dans l'étude de Bagley et al.

Enfin, la présence concomitante de leucocyturie, hématurie et/ou bactériurie n'est pas associée à des différences significatives du RPCU.

Ces deux études ont aussi étudié l'effet de l'hématurie sur le RPCU via une contamination sanguine iatrogène [66,67]. Pour ce faire, du sang total (dont l'hématocrite et la protidémie ou albuminémie étaient connus) a été ajouté dans différentes proportions à un spécimen d'urines canines.

L'étude de Bagley et al. a conclu qu'une hématurie macroscopique et/ou un nombre d'hématies trop important pour permettre un comptage précis des hématies à l'examen cytologique du culot urinaire (soit > 250 hématies/champ au fort grossissement) étaient associés à des valeurs de RPCU comprises entre 1,5 et 30,6 [66]. En routine, on attribue souvent une protéinurie à l'hématurie quand celle-ci est soit microscopique (découverte à la lecture du culot urinaire), soit diagnostiquée à la lecture de la plage « sang » de la bandelette urinaire.

L'étude de Vaden et al a obtenu des résultats contradictoires [67]. En effet, les RPCU mesurés n'excédaient pas 0,4 (valeur encore souvent considérée comme normale) quel que soit le degré d'hématurie, même dans le cas d'hématurie macroscopique et/ou plus de 250 hématies/champ à la lecture du culot urinaire. Finalement, d'après cette étude, l'hématurie même macroscopique ne devrait pas être considérée dans le diagnostic différentiel de la protéinurie.

Une étude rétrospective clinique a considéré les urines de 65 chiens. 65% des spécimens (42/65) présentant des anomalies cytologiques à la lecture du culot urinaire (hématurie, leucocyturie et/ou bactériurie) avaient un RPCU strictement inférieur à 1. De plus, seulement 35% des spécimens (23/65) associés à un RPCU supérieur à 1 présentaient des anomalies microscopiques parmi celles précédemment citées [68].

Enfin, certains auteurs ont démontré l'absence de différence significative entre l'excrétion protéique urinaire sur 24 heures d'un chien sain présentant un sédiment urinaire actif et celle d'un chien sain avec sédiment inactif [3].

Finalement, il convient de rester prudent avant de classer une protéinurie comme étant d'origine rénale dans un contexte d'hématurie ou d'inflammation du tractus urinaire.

## 2.2. Liés à la technique

### 2.2.1. Méthode de prélèvement

En pratique, les urines peuvent être récoltées par cystocentèse, par miction spontanée ou par sondage (cathétérisation de l'urètre). Le prélèvement par miction spontanée présente l'inconvénient majeur d'exposer le prélèvement à une contamination par le bas appareil urinaire, l'appareil génital et la peau. On peut donc potentiellement retrouver la présence de débris cellulaires voire de bactéries et de cellules inflammatoires dans le spécimen récolté. Malgré cela, l'analyse physico-chimique de ces urines est couramment admise. Il semble préférable dans ce cas de privilégier les urines de milieu de miction. Il est aussi préférable de prélever les urines du matin, ce qui permet de s'affranchir d'une dilution occasionnée par une consommation d'eau importante au cours de la journée [69].

De la même façon, le sondage urétral présente l'inconvénient majeur de modifier la composition urinaire à cause de microtraumatismes induits par le cathétérisme (d'où la présence de sang et de cellules à la cytologie urinaire), sans oublier que les lésions causées à l'urothélium associées à un non-respect des règles strictes d'asepsie sont une cause fréquente d'infections du tractus urinaire. Cependant, l'influence du sondage urétral sur le RPCU n'a pas fait l'objet d'études et n'est donc pas établi à notre connaissance.

En revanche, les prélèvements par cystocentèse permettent d'obtenir des urines parfaitement stériles (à condition d'être associés à une tonte et une désinfection préalables de la région abdominale en regard du site de ponction) mais sont fréquemment contaminés par du sang, d'où une hématurie microscopique artéfactuelle simplement liée à la méthode de prélèvement [69] qui pourrait néanmoins induire une augmentation (le plus souvent légère) de la valeur du RPCU.

Paradoxalement, plusieurs études chez le chien sain ont montré que le RPCU n'est que peu affecté par la méthode de collecte, même dans le cas où le sédiment est actif [5,70].

### 2.2.2. Conservation des spécimens : température et délai d'analyse

Une étude s'est attachée à mimer les conditions de la pratique quotidienne afin d'étudier l'influence des conditions pré-analytiques associées [71]. En routine, les spécimens sont

souvent envoyés dans un laboratoire extérieur et de ce fait analysés dans les 3 jours à une semaine suivant la collecte, les spécimens étant conservés à température ambiante ou stockés à 4°C. Cette étude s'est aussi penchée sur les conditions pré-analytiques des études rétrospectives, les spécimens étant fréquemment analysés jusqu'à plusieurs mois après le prélèvement, conservés généralement congelés (à -20°C).

Plusieurs résultats intéressants ont été tirés de cette étude [71] :

- Stockage à température ambiante (environ 20°C) :

Celui-ci induit une augmentation pré-analytique de la concentration en protéines urinaires et donc du RPCU. Cependant, aucune différence significative n'a été constatée concernant la concentration urinaire en protéines, en créatinine et le RPCU, pendant les 4 premières heures et jusqu'à 12h après le prélèvement. Néanmoins, des analyses à des intervalles de temps plus courts et sur un plus grand nombre de spécimens permettraient de savoir si de plus petites durées de stockage peuvent aussi être associées à des modifications significatives de ces analytes.

- Stockage à 4°C (réfrigération) :

Dans ce cas, une augmentation du RPCU significative mais transitoire est notée après 12 heures de stockage (potentiellement liée à un refroidissement trop lent). En parallèle, la concentration en créatinine urinaire ne varie de manière significative qu'après une semaine de stockage, contrairement à la concentration en protéines urinaires qui est plus stable.

- Stockage à -20°C (congélation) :

La variabilité pré-analytique est faible, bien que l'on observe occasionnellement une différence, parfois significative, mais celle-ci est davantage pénalisante d'un point de vue statistique que biologique ou diagnostique. Les concentrations en créatinine et en protéines urinaires et donc le RPCU sont très peu affectés par les conditions pré-analytiques dans le cas de la congélation à -20°C.

Par ailleurs, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette augmentation de la concentration urinaire en protéines à température ambiante :

1/ Une dénaturation des protéines, ce qui en théorie aurait entraîné une diminution plutôt qu'une augmentation de la concentration en protéines dans le spécimen.

2/ Une déshydratation de l'échantillon. Dans ce cas, une augmentation concomitante de la concentration en créatinine aurait été observée, ce qui aurait minimisé les conséquences sur la mesure finale du RPCU.

3/ Une bactériurie est une autre explication plausible à ce phénomène (malgré l'absence de suspicion à l'examen cytologique du culot urinaire). L'augmentation de la concentration en protéines urinaires pourrait s'expliquer par la présence de protéines bactériennes, bien qu'aucune bactériologie urinaire n'ait été effectuée dans le cadre de cette étude et sachant que seule une bactériurie décelable à la cytologie urinaire pourrait être responsable d'une augmentation significative du RPCU, ce qui rend finalement cette hypothèse peu probable [67].

4/ Le mode de prélèvement, par une fuite de protéines des cellules épithéliales, souvent présentes en plus grandes quantités dans les échantillons prélevés par miction spontanée (bien que les spécimens aient été immédiatement centrifugés après le prélèvement). Cependant, cette étude n'a montré aucune différence significative sur la base du mode de prélèvement.

Étonnamment, les mêmes différences significatives sont observées que le sédiment soit actif ou non. Seule une étude qualitative de la protéinurie (par électrophorèse ou Western Blot) permettrait de comprendre quelles protéines sont responsables des modifications observées lors du stockage. Mais cela n'a que peu d'intérêt d'un point de vue pratique. Ce qu'il faut retenir, c'est que cette augmentation du RPCU lors du stockage peut induire des erreurs diagnostiques, précisément quand la valeur du RPCU est proche des seuils de décision de la classification établie par l'IRIS [71].

Finalement, quelques recommandations simples peuvent être retenues afin d'éviter des augmentations du RPCU liées aux conditions de stockage. Les spécimens doivent idéalement être congelés ou conservés à +4°C et dans ce cas analysés dans les 3 jours suivant le prélèvement. Analyser le spécimen dans les 12 premières heures après son prélèvement en le conservant à température ambiante est aussi possible [71].



### 3. Facteurs de variations analytiques du RPCU

#### 3.1. Les facteurs de variation analytiques non spécifiques

Parmi les facteurs de variations analytiques non spécifiques du RPCU, on retrouve classiquement la température ambiante du laboratoire, ainsi que les instruments, le lot de réactif ainsi que le manipulateur.

Il existe aussi des facteurs de variabilité analytiques spécifiques. Il paraît logique que la variabilité analytique du rapport protéines urinaires sur créatinine urinaire soit conditionnée par la variabilité analytique du dosage individuel des protéines urinaires et par celle du dosage de la créatinine urinaire c'est pourquoi elles seront détaillées séparément.

#### 3.2. Technique de dosage des protéines urinaires

##### 3.2.1. Principes des techniques

Il n'existe pas de technique de référence pour le dosage des protéines urinaires [72]. Les méthodes les plus utilisées en laboratoire sont les dosages colorimétriques dont le principe est simple : après liaison des protéines avec le colorant, le spectre d'absorption de ce dernier est modifié et la différence d'absorption entre les deux spectres est proportionnelle à la concentration en protéines. Plusieurs chromogènes ont été utilisés ; actuellement on utilise le bleu de Coomassie et le rouge de pyrogallol. Cette dernière technique a été décrite par Fujita en 1983 et adaptée aux protéines urinaires par Watanabe en 1986 [73]. Le rouge de pyrogallol combiné avec le molybdate, forme un complexe qui absorbe à 460 nm. En milieu acide, la fixation du colorant sur les groupements aminés des protéines déplace le pic d'absorption à 598 nm [73].

##### 3.2.2. Caractéristiques métrologiques

###### 3.2.2.1. *Sélectivité-Spécificité analytique*

L'affinité du rouge de pyrogallol varie en fonction de la nature des protéines constitutives du spécimen [72,74]. Il a été démontré sur des échantillons de liquide céphalo-rachidien (LCR) chez le chien que le rouge de pyrogallol sous-estimait légèrement mais de manière significative les globulines et l'albumine purifiées de solutions de contrôle [75]. En effet,

l'affinité du rouge de pyrogallol y est 20% plus faible pour les globulines que pour l'albumine, tout comme dans les échantillons humains [76]. C'est le cas pour de nombreux tests de dépistage semi-quantitatifs utilisés en routine comme les bandelette urinaires, mais aussi pour les dosages au bleu brillant de Coomassie pour lesquels l'albumine est généralement mieux détectée que les globulines [3,77]. D'autres auteurs rapportent que le rouge de pyrogallol est environ 30% moins sensible pour les gamma-globulines que pour l'albumine [74].

Tout ce qui a été dit précédemment implique que les résultats peuvent varier selon :

1/ Les proportions relatives des protéines éliminées.

2/ La nature des protéines utilisées pour la calibration de l'analyse (cf. § 3.2.2.3.).

- Albumine et globulines :

Le pourcentage de récupération des protéines d'un mélange pur de protéines (albumine et gamma-globulines, avec un rapport albumine/globulines variant de 0 à 10) est d'environ 79% pour la technique au rouge de pyrogallol (et de 77% avec ajout de SDS) [78], ce pourcentage étant défini par le ratio (exprimé en pourcentages) entre la concentration en protéines observée et celle attendue, calculée par une méthode dite de référence [75–78] . En utilisant 26 sérums dilués prélevés sur des individus souffrant de myélome multiple (avec un rapport albumine/globulines compris entre 0,39 et 2,35), le pourcentage de récupération des protéines par la technique au rouge de pyrogallol était de 63% (et 83% avec ajout de SDS) [78].

Tous ces résultats sont en accord avec Watanabe qui a démontré que le pourcentage de récupération des protéines avec la technique au rouge de pyrogallol était sous-évalué, particulièrement quand le rapport albumine/globulines est bas (d'environ 80% pour une solution pure de gamma-globulines) [73].

- Cas des chaînes légères d'immunoglobulines :

Plusieurs auteurs rapportent un risque important de sous-estimation de la protéinurie par le rouge de pyrogallol pour les échantillons urinaires contenant de grandes quantités de chaînes légères monoclonales [72,74], ce qui est cohérent avec ce qui a été rapporté chez l'homme. En effet, la protéinurie de Bence Jones (chaînes légères d'immunoglobuline retrouvées dans

les urines dans le cas de myélome multiple ou de maladie de Waldenström) est sous-estimée d'environ 30% par le rouge de pyrogallol [7,72].

Le Bricon et al. ont noté qu'il existait une très grande variabilité des pourcentages de récupération des chaînes légères d'immunoglobulines selon les spécimens (45 à 69%) [72]. Certaines études rapportent que l'ajout de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) améliore ces résultats [72,74], sans toutefois faire complètement disparaître cet inconvénient puisque ces mêmes auteurs rapportaient la persistance d'une réactivité non satisfaisante du rouge de pyrogallol vis à vis des chaînes légères, et ce malgré l'addition de SDS [79].

- Etat des protéines :

Plusieurs études ont mis en évidence le fait que de nombreuses protéines excrétées par les reins ne le sont pas intactes. En effet, les protéines de masse moléculaire élevée (comme l'albumine) subissent une dégradation dont les produits sont ensuite excrétés dans les urines [80]. Par exemple, chez le rat, environ 90% de l'albumine excrétée l'est sous forme dégradée, et chez l'homme cette valeur serait encore plus élevée [81]. Dans certaines affections (comme le diabète chez l'homme), cette proportion d'albumine dégradée dans les urines diminue [82,83]. Celle-ci semble être associée à la sévérité et à la progression de la maladie [83].

La technique de dosage au rouge de pyrogallol est moins sensible aux fragments d'albumine qu'à l'albumine intacte. En effet, elle détecte moins de 10% des protéines dégradées (la concentration en protéines d'un mélange composé uniquement de fragments protéiques digérés mesurée par la technique au rouge de pyrogallol donne une valeur égale à 0,07 g/L contre une concentration de 0,72 g/L avec la méthode du Biuret) [83].

- Substances médicamenteuses :

Les interférences médicamenteuses dans le cadre du dosage des protéines ont été très largement étudiées [56]. Cependant peu d'études ont évalué la réponse relative des différentes méthodes de dosage des protéines à un même médicament [84]. La chlorpromazine [73,85], la néomycine [85] et la gentamicine [73,86] interfèrent avec la méthode de dosage au rouge de pyrogallol. L'interférence des aminosides a été montrée pour

la tobramycine, la paromomycine, la kanamycine, la streptomycine et la dihydrostreptomycine [87].

### 3.2.2.2. *Imprécision*

Plusieurs études ont déterminé les CV intra-essai et inter-essais du dosage des protéines au rouge de pyrogallol [71,73–75,79]. Les valeurs obtenues dans ces différentes études sont globalement acceptables, c'est-à-dire inférieures à 10% excepté pour un cas avec des urines de contrôle à 0,136g/L de protéines [74] (Annexe 1).

En outre, la précision de cette méthode semble dépendre de l'analyseur utilisé (d'après le fournisseur du réactif rouge de pyrogallol utilisé dans notre étude).

### 3.2.2.3. *Inexactitude*

Selon les fabricants, les solutions de calibration varient notablement : albumine humaine, albumine bovine, urines (d'espèce non précisée) plus ou moins modifiées (sans que la nature des protéines ajoutées soit indiquée), dilutions de sérum...

Cela a deux conséquences principales :

- 1/ La comparaison inter-laboratoires n'est pas garantie *a priori* et un clinicien doit avoir recours à un seul et même laboratoire utilisant toujours la même technique.
- 2/ Les valeurs des intervalles de référence et des seuils de décision donnés dans la littérature doivent être utilisées avec prudence.

L'exactitude de la technique dans les valeurs basses a été appréciée en dosant un standard à 0,2 g/l dilué au 1 : 2 avec du NaCl 0,9 %. La moyenne des 13 mesures réalisées était de 0,109 g/l pour une valeur théorique attendue de 0,100 g/l, ce qui représente un écart de 9 % par rapport à la valeur attendue, avec un CV de 2,7 % [79].

Par ailleurs, l'exactitude de la méthode au rouge de pyrogallol (avec ajout de SDS) a été évaluée en comparaison à une méthode du Biuret modifiée à partir de 206 spécimens. Le pourcentage de récupération des protéines était alors de 97,7% avec un coefficient de corrélation entre les deux méthodes  $r = 0,951$  [74].

- Influence du calibrateur sur l'exactitude :

En utilisant un calibrateur spécifique pour protéines urinaires, la performance de la méthode au rouge de pyrogallol est similaire à celle utilisant d'autres réactifs comme le bleu de Coomassie [88]. Toutefois, les résultats peuvent être améliorés en utilisant pour calibrateur un mélange d'albumine et de globulines, comme cela est recommandé en médecine humaine [76]. Ils ne sont pourtant pas utilisés en routine, probablement du fait de leur faible disponibilité. La dilution d'un sérum humain ou animal pourrait aussi permettre d'obtenir de bons résultats bien qu'introduisant un biais supplémentaire, les proportions relatives d'albumine et de globulines étant variables selon l'espèce et l'individu [75]. Ainsi, la comparaison inter-laboratoires dépend notamment de l'utilisation d'un même calibrateur.

- Influence des réactifs sur l'exactitude :

La composition très hétérogène des nombreux réactifs présents sur le marché (pureté et concentration du colorant, additifs de type SDS) est un réel problème aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, associée à une variabilité importante de l'exactitude des résultats (avec les réactifs Beckman : + 45 % ; Dade : + 20 % ; Sigma : + 20 % ; Eurodiag : + 11 % par rapport à la cible lors du Contrôle National de Qualité des laboratoires d'humaine en 1998) [89]. Par conséquent, pour un réactif donné les CV inter-laboratoires sont aussi très variables de 5,9 % (Dade) à 14,7 % (Biodirect) [89]. Outre la composition des réactifs, les conditions d'étalonnage expliquent sans doute une partie de ces différences avec deux calibrateurs utilisés en France : l'albumine (bovine ou humaine) et les mélanges albumine/gamma-globulines [89].

- Contrôle National de Qualité (CNQ) :

Il faut savoir que la notion de contrôle de qualité pour les protéines urinaires (et plus largement pour la chimie urinaire) est relativement récente en France et a fait l'objet de deux revues générales publiées en 2000 [90,91]. Le Contrôle National de Qualité externe obligatoire (CNQ) organisé par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) mis en place en 1978 n'a réalisé que peu d'enquêtes pour les urines, ce qui rend difficile l'analyse des évolutions techniques. Plusieurs éléments d'un contrôle publié sont néanmoins intéressants à souligner, les CV inter-laboratoires étant notamment supérieurs

à 10 %. Les spécimens de contrôle étaient alors des préparations artificielles de protéines humaines contenant 60 à 70 % d'albumine, le reste étant constitué de transferrine et d'immunoglobulines.

#### 3.2.2.4. *Gamme analytique*

- Limite de détection, limite de quantification et domaine de linéarité :

La limite de détection est la plus petite quantité d'analyte dont on puisse dire avec un niveau de confiance donné qu'il est présent dans le spécimen. Quant à la limite de quantification, il s'agit de la plus petite quantité d'analyte qui peut être quantifiée avec un niveau de confiance donné.

La limite de détection de la méthode a été estimée à 0,045 g/L (à partir de 35 mesures successives du blanc réactif, la limite de détection étant alors considérée comme égale à 3 fois l'écart-type) [79] et à 0,035 g/L dans une autre étude [74].

L'un des principaux avantages du dosage au rouge de pyrogallol est sa limite de quantification basse, lui permettant d'explorer des protéinuries dites physiologiques [92].

Le domaine de linéarité du dosage des protéines urinaires avec le rouge de pyrogallol est compris entre 0,045 à 2,0 g/L [74,79]. Rappelons que chez le chien, la limite supérieure de protéines dans les urines définissant la protéinurie varie selon les sources : 0,56 g/L [17] ou encore 0,640 g/L [5], mais ce sont deux valeurs très proches.

Le rouge de pyrogallol pour le dosage des protéines urinaires a été recommandé plutôt que le bleu brillant de Coomassie, fournissant une réponse plus uniforme et linéaire aux différentes protéines constitutives [73,74,76]. Le rouge de pyrogallol utilisé pour le dosage des protéines dans le LCR permet aussi une meilleure récupération des protéines comparé au Bleu brillant de Coomassie et présente un domaine de linéarité couvrant l'intervalle de référence de la protéinorachie dans le LCR notamment [93].

- Autres :

Les effets de la température et du pH ont aussi été étudiés. Il a notamment été démontré que l'absorbance du rouge de pyrogallol (fixée normalement à 600 nm) diminue quand la

température augmente de 12 à 25°C mais reste stable entre 25 et 37°C. De plus, l'absorbance d'une solution d'albumine semble maximale à un pH compris entre 2,5 et 3,0. L'absorbance d'une solution de globulines serait maximale à un pH compris entre 2,25 et 2,5 [73]. Ceci reste anecdotique étant donnée la gamme de pH des urines de chiens rencontrée.

### 3.3. Techniques de dosage de la créatinine urinaire

#### 3.3.1. Principe des techniques

Il n'existe pas à l'heure actuelle de procédure standardisée recommandée pour la mesure de la créatinine urinaire, que ce soit chez l'homme ou les animaux. Parmi les méthodes de dosage disponibles en routine, aussi bien pour le dosage de la créatinine plasmatique qu'urinaire, on peut citer la méthode Jaffé et celles enzymatiques.

La méthode Jaffé est fondée sur la formation d'un chromogène jaune-orange par l'action des ions picrate sur la créatinine à un pH alcalin.

#### 3.3.2. Caractéristiques métrologiques

##### 3.3.2.1. *Sélectivité-Spécificité analytique*

Les ions picrate agissent aussi sur plusieurs autres substances comme la bilirubine, les lipides, mais aussi l'acétone et le glucose. La réaction de Jaffé peut ainsi surestimer la concentration en créatinine plasmatique jusqu'à 45% chez les chiens sains [26]. L'interférence liée à ces chromogènes autres diffère d'un chien à un autre et ainsi, un facteur de correction ne peut pas être appliqué pour convertir les mesures obtenues avec la méthode Jaffé en les véritables concentrations en créatinine. Les méthodes enzymatiques, hautement spécifiques, sont ainsi recommandées pour le dosage de la créatinine plasmatique. Cependant, les substances pouvant interférer avec le réactif Jaffé étant proportionnellement moins abondantes dans les urines que dans le plasma, les résultats de mesure de la créatinine urinaire par la méthode Jaffé sont rapportés comme ne surestimant pas ou modérément les valeurs réelles, d'environ 6% au plus [26].

### 3.3.2.2. *Imprécision et inexactitude*

La précision des techniques de routine classiquement utilisées pour la mesure de la concentration urinaire en créatinine est considérée comme insatisfaisante. Ces difficultés, déjà rapportées pour le détermination de la clairance endogène de la créatinine, étaient attribuées à la faible spécificité de la réaction de Jaffé utilisée dans une étude [94]. Cependant, il a été démontré que la créatinine urinaire peut facilement être mesurée par la méthode Jaffé avec la même précision et exactitude que les méthodes enzymatiques, plus coûteuses [27].

De grandes dispersions inter-laboratoires sont rapportées pour le dosage de la créatinine urinaire. Cela est en grande partie attribué à l'imprécision de la mesure de la créatinine, déjà rapportée dans le sérum chez l'homme [95,96]. Le CV intra-essai de mesure de la concentration en créatinine urinaire, déterminé à partir de 20 mesures consécutives de 25 spécimens distincts, a été calculé égal à 2% (IC 95% = [0,8 ; 14,2] dont 22/25 spécimens avec un CV inférieur à 5%) [71].

Une étude s'est attachée à évaluer l'inexactitude et l'imprécision de la mesure de la concentration urinaire en créatinine [27]. Plusieurs facteurs potentiels d'imprécision et d'inexactitude ont été étudiés, notamment la dilution des urines préalable au dosage, les spécificités des méthodes ainsi que les calibrateurs et analyseurs utilisés.

- L'effet dilution :

Les techniques utilisées habituellement pour la mesure de la créatinine plasmatique nécessitent une dilution préalable afin que le résultat obtenu soit compris dans le domaine de linéarité de la méthode, ce qui pourrait introduire un biais dans la précision des résultats. La dilution de la créatinine préalable au traitement des urines est généralement fixée à 1 : 20 par la majorité des instruments en routine [27,71]. Dans la plupart des cas, cette dilution permet de garantir des résultats dans les limites de linéarité indiquées par le fabricant [27].

Toutefois, les erreurs possibles liées à une seconde dilution d'échantillons très concentrés pourraient être évitées en diluant au départ à 1 : 40 ou 1 : 50 au lieu de 1 : 20 et permettre néanmoins les mesures des échantillons même à de faibles concentrations [27]. Certains



préconisent d'augmenter la dilution à 1 : 100 afin d'améliorer la fiabilité de la méthode dans ce cas (afin que la concentration en créatinine urinaire soit dans le domaine de linéarité) [71]. En revanche, pour des spécimens peu concentrés, une pré-dilution à 1 : 100 paraît excessive, avec pour conséquence une valeur de créatininurie proche ou inférieure de la limite de détection d'où une imprécision et une inexactitude majorées. Pour ces spécimens, une pré-dilution à 1 : 20 est recommandée [71].

Finalement, la pré-dilution des urines pour la mesure de la créatinine urinaire a été fixée à 1 : 50 dans une étude évaluant la variabilité analytique du RPCU [71], l'urine devant être diluée à une concentration finale de 0,34 à 0,64 g/L pour rentrer dans le domaine de linéarité de la méthode Jaffé d'après les données du fabricant.

- Inexactitude et calibrateur :

L'inexactitude de la méthode Jaffé a été calculée à partir de solutions commerciales d'urines humaines et a été rapportée inférieure à 5% [27]. Il est probable que l'on obtienne de meilleures précision et exactitude en utilisant un calibrateur avec une concentration en créatinine supérieure à 20 mg/L, ce qui convient habituellement pour le dosage de la créatinine plasmatique. Mais malgré la faible concentration du calibrateur, l'inexactitude est inférieure à l'imprécision, aboutissant à une erreur globale maximale d'environ 15%, ce qui est habituellement toléré en médecine humaine [27].

- L'effet analyseur :

Les analyseurs disponibles chez les praticiens en routine ne sont pas adaptés à la mesure de la créatinine urinaire avec exactitude à de hautes concentrations car ils ont tendance à la sous-estimer, parfois largement. Même à de plus faibles concentrations en créatinine urinaire, ce qui est souvent observé dans les cas de polyurie, l'inexactitude est importante avec les analyseurs à plaques (Vitros et Vetest), alors qu'elle est acceptable avec des analyseurs utilisant des bandelettes tests (Reflovet) [27].

- Conclusion :

Enfin, l'inexactitude de la mesure de la créatinine urinaire montre le réel besoin d'une validation de l'exactitude des méthodes utilisées dans chaque laboratoire et de l'utilisation d'un intervalle de référence spécifique (de l'analyseur et de la technique utilisés par le laboratoire) pour la concentration en créatinine urinaire et pour les ratios de concentration de chaque analyte rapportée à celle de la créatinine urinaire. D'autre part, la sous-estimation de la créatinine urinaire peut mener à une surestimation du ratio et à de possibles faux positifs. De plus, l'imprécision de la mesure de la créatinine étant relativement haute, des mesures répétées (triplicata) permettraient d'obtenir des résultats plus précis.

#### 3.4. Critères métrologiques du RPCU

Le RPCU peut être évalué à partir d'un unique spécimen d'urine prélevé à n'importe quel moment de la journée [71]. Sa fiabilité est fondée sur le postulat que ce test est précis et non influencé par des facteurs pré-analytiques et analytiques (comme la répétabilité, la pré-dilution des spécimens nécessaire au dosage de la créatinine urinaire...). De plus, en pratique courante, la plupart des spécimens sont envoyés dans des laboratoires extérieurs pour la mesure du RPCU. La température de conservation ainsi que le délai d'analyse sont alors des facteurs potentiels de variabilité. Il y a peu d'études à notre connaissance qui évoquent la variabilité analytique du RPCU [71]. On pourrait penser celle-ci dépend directement et uniquement de la variabilité analytique des dosages des protéines et de la créatinine urinaires. Mais l'imprécision de la mesure du RPCU a été estimée à 8,6% et ne semble pas être déduite de celles de la créatinine urinaire ou des protéines urinaires (estimées respectivement à 2% et 8,3%) [71].

Chaque spécimen d'urine dont le RPCU est mesuré, est classé sur la base du résultat obtenu comme non protéinurique, douteux ou protéinurique. Il y a donc 2 valeurs seuils séparant ces 3 classes. Leur valeur est variable selon les auteurs et a été revue et corrigée au fil du temps. Actuellement pour le chien, the International Renal Interest Society préconise les valeurs de 0,2 et 0,5 [31]. Il est généralement considéré comme judicieux d'évaluer les performances analytiques d'une méthode de dosage autour des valeurs dites « critiques » correspondant à

ces seuils de décision, pouvant être affectées par la variabilité analytique de la méthode et induire des erreurs de classification des spécimens.

- Fréquence d'erreur de classification des spécimens :

La fréquence d'erreur de classification du spécimen à partir de la valeur du RPCU a été estimée à partir du dosage de spécimens dont la valeur moyenne du RPCU était proche des seuils décisionnels (0,2 et 0,5) [71]. Chaque spécimen a été analysé à 20 reprises. Les résultats inférieurs ou égaux à 0,2 et ceux strictement supérieurs à 0,2 ont été comptabilisés et ont permis d'en déduire le RPCU moyen du spécimen ainsi que la fréquence moyenne d'erreur de classification pour ces spécimens. Finalement, la fréquence moyenne d'erreur pour des RPCU proches de 0,2 et 0,5 était de 20% et 43% respectivement (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1 : Erreurs de classification autour du seuil RPCU = 0,2 [71].

	Spécimen 1	Spécimen 2	Spécimen 3	Spécimen 4	Spécimen 5
RPCU moyen	0,17	0,21	0,22	0,23	0,23
RPCU $\leq$ 0,2	20	9	9	2	0
RPCU $>$ 0,2	0	11	11	18	20

Tableau 2 : Erreurs de classification autour du seuil RPCU = 0,5 [71].

	Spécimen 1	Spécimen 2	Spécimen 3
RPCU moyen	0,48	0,5	0,51
RPCU $\leq$ 0,5	14	9	9
RPCU $>$ 0,5	6	11	11

- Sources analytiques d'erreurs de classification des spécimens :

En règle générale, l'inexactitude et l'imprécision des méthodes de dosage (de la créatinine et des protéines urinaires) peuvent être responsables d'erreurs de classification des spécimens.

La précision intra-essai, déterminée à partir de 20 mesures consécutives de 25 spécimens distincts, est plus faible pour la créatinine urinaire que pour les protéines urinaires, pouvant potentiellement induire une erreur de classification pour des spécimens dont les RPCU sont proches des valeurs seuils de décision recommandées par The International Renal Interest Society (0,2 et 0,5) [71].

La technique Jaffé de dosage de la créatinine urinaire, de par son inexactitude et la dispersion des résultats obtenus, peut être à l'origine d'interprétations erronées des résultats du RPCU et rendre critiquables les seuils de décision communément acceptés, sans compter que le type d'analyseur ayant servi à effectuer le dosage peut affecter le résultat [27].

Par exemple, un chien avec des urines présentant une concentration en protéines de 0,3 g/L et une concentration en créatinine de 900 à 1100 mg/L aurait donc un RPCU allant de 0,25 à 0,33 (en utilisant l'analyseur Elimat) et devrait donc être considéré comme normal. Avec 3 analyseurs de routine, on obtient des valeurs de RPCU allant de 0,27 à 0,36, 0,38 à 0,80 et 0,42 à 0,57 (avec le Reflovet, Vitros et Vetest respectivement) [27], ce qui peut poser problème d'après les seuils de décision donnés dans l'étude : 0 à 0,3 pour un animal normal, de 0,3 à 1 valeur comprise pour un animal douteux et strictement supérieur à 1 pour des urines protéinuriques [1].

Une sous-estimation de la concentration en protéines urinaires est aussi possible dans les situations suivantes :

- Une forte proportion de globulines, pour lesquelles l'affinité du rouge de pyrogallol est plus faible que l'albumine [3,77].
- La présence de pigments en cas d'hémoglobinurie notamment.
- La présence de grandes quantités de chaînes légères monoclonales [7,72].
- Les interférences médicamenteuses [56].

Il a été démontré que pour des échantillons d'urines fortement diluées ou plus généralement avec une très faible concentration en protéines et créatinine urinaires, la variabilité analytique est majorée, comme cela est rapporté pour de nombreux analytes biochimiques à des valeurs approchant le seuil de détection. Cela peut potentiellement induire des erreurs de classification si l'on se réfère aux données de la classification IRIS [71]. C'est pourquoi il faut avoir en tête la valeur de la densité urinaire au moment d'interpréter les résultats d'un

RPCU [97]. En revanche, la mesure du RPCU sur des urines très concentrées ne manque que modérément de précision. Cette imprécision peut être attribuée à une valeur de créatinine urinaire au-delà du seuil de détection de la méthode [71].

## **4. Critères d'interprétation du RPCU**

### 4.1. Place du RPCU dans le cadre de l'exploration et du suivi d'une protéinurie

Le dépistage, la confirmation et la quantification d'une protéinurie via le RPCU sont indispensables dans l'évaluation des affections rénales et urinaires comme souligné dans les ouvrages de néphrologie [1,16,60,98–100] et de nombreux articles de revue [31,69,101–103].

La protéinurie a fait l'objet de maintes publications, dont une constituant un document de consensus de l'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) [31] qui a servi de support à la rédaction du paragraphe suivant. Plusieurs recommandations ont été tirées de ce document aussi bien pour l'exploration diagnostique que le traitement et le suivi d'une protéinurie.

- Recommandations pour l'exploration d'une protéinurie :

Du fait de son intérêt clinique, une exploration diagnostique rationnelle et hiérarchisée de la protéinurie doit être mise en œuvre dès la moindre suspicion. Dans ce cadre, plusieurs étapes analytiques sont nécessaires préalablement à l'étape de mesure du RPCU, souvent ultime (sauf si l'analyse qualitative de la protéinurie par une électrophorèse des protéines urinaires est demandée).

La protéinurie est le plus souvent détectée par les méthodes de dépistage semi-quantitatives (lecture de la bandelette urinaire notamment) au cours de l'analyse urinaire de routine. Il est primordial de déterminer ensuite si cette protéinurie est vraie ou s'il s'agit d'un faux-positif. C'est pourquoi il est intéressant de connaître les causes d'erreurs pré-analytiques et analytiques de ces méthodes de dépistage, sachant qu'il est toujours judicieux de confronter ce résultat à la mesure d'un RPCU permettant de confirmer ou infirmer la présence d'une protéinurie. Classiquement, un pH urinaire alcalin ( $\text{pH} > 7.5$ ) peut être responsable de faux-

positifs à la lecture de la plage protéine de la bandelette urinaire. Le test à l'acide sulfosalicylique (test ASS) est préconisé dans ce cas pour écarter ces faux-positifs.

Finalement, 3 situations sont possibles :

- Une forte réaction positive à la bandelette urinaire (confirmée ou non au test ASS) est une indication à procéder à la mesure d'un RPCU immédiatement ou après confirmation de la persistance de la protéinurie par les mêmes méthodes 2 à 4 semaines plus tard.
- Une réaction faiblement positive à la bandelette urinaire (traces de protéines) confirmée au test ASS est une indication à répéter le test 2 à 4 semaines plus tard et à envisager la mesure d'un RPCU si la réaction positive persiste (même faiblement).
- Une réaction négative à la bandelette urinaire (confirmée ou non au test ASS) est suffisante pour exclure toute forme de protéinurie (sauf la microalbuminurie).

L'étape suivante consiste à écarter les origines pré et post-rénales de protéinurie ainsi qu'une éventuelle contamination des urines (génitale ou cutanée). Pour ce faire, il y a quelques recommandations simples à suivre. Il est conseillé de procéder à :

- 1/ Une analyse d'urines prélevées par cystocentèse afin de s'affranchir d'une potentielle contamination.
- 2/ Un dosage de la concentration en protéines plasmatiques en parallèle, afin de pouvoir exclure une protéinurie pré-rénale secondaire à une dysprotidémie (même s'il s'agit d'une cause relativement rare de protéinurie chez le chien).
- 3/ Un examen cytologique du culot urinaire (associé au besoin à une bactériologie urinaire), afin d'écarter toute cause de protéinurie post-rénale (cf § 2.1.5). Néanmoins, il faut souligner qu'une atteinte purement rénale ou pré-rénale à l'origine de la protéinurie identifiée ne peut être écartée sur la base seule de l'observation de signes d'atteinte du bas appareil urinaire lors de la lecture du culot urinaire [67,104].

Finalement, 3 points-clés doivent être évalués dans le cadre de l'exploration d'une protéinurie lorsque celle-ci est considérée comme vraie et d'origine rénale :

1/ **La localisation de l'affection** : Une classification des protéinuries pathologiques en 3 catégories a été proposée distinguant protéinurie pré-rénale, rénale et post-rénale. Localiser la protéinurie de cette façon est primordial car cela permet notamment d'aiguiller le clinicien

sur l'affection sous-jacente. Cependant, cette étape n'est possible qu'à condition que l'anamnèse et les commémoratifs précis de l'animal soient disponibles. De même, les résultats de l'examen clinique de l'animal ainsi que ceux de l'analyse urinaire complète doivent être consignés (comprenant *a minima* la densité urinaire, les résultats de la bandelette urinaires et la lecture du culot urinaire).

**2/ La persistance de la protéinurie :** chez le chien, une protéinurie persistante est définie par un RPCU supérieur ou égal à 0,5 obtenu sur au minimum 3 échantillons espacés d'au moins 2 semaines [31,60]. Il est admis qu'une telle protéinurie est considérée comme rénale, les causes pré-rénales et post-rénales étant moins probablement associées à une protéinurie persistante [105].

**3/ Le degré de la protéinurie :** L'évaluation quantitative de la protéinurie via un RPCU est cruciale dans le cadre de la démarche diagnostique mais aussi de la prise en charge thérapeutique, comprenant le suivi clinique de l'animal et de l'effet d'un éventuel traitement anti-protéinurique. Des méthodes immunologiques permettent également de déterminer l'albuminurie mais ne sont pas pratiquées en routine.

Cette démarche permet finalement de caractériser la protéinurie :

- Une atteinte fonctionnelle est souvent responsable d'une protéinurie légère et transitoire, disparaissant avec la récupération clinique de l'animal.
- Une légère protéinurie persistante peut être liée à une atteinte glomérulaire ou tubulaire. Dans ce cas, ces deux types de protéinuries ne peuvent être distinguées avec certitude à l'aide des tests conventionnels disponibles couramment. Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des examens complémentaires spécialisés (électrophorèse des protéines urinaires) pour distinguer une protéinurie tubulaire et glomérulaire (ou mixte). Cependant, l'expérience montre qu'une augmentation de la protéinurie (jusqu'à dépasser la valeur seuil de RPCU égale à 2,0) suffit souvent à classer cette protéinurie comme glomérulaire.

De plus, dans certains cas d'atteinte tubulaire, la protéinurie peut être accompagnée d'une glycosurie en l'absence d'hyperglycémie ou d'une excrétion électrolytique anormale, voire des deux ce qui dans ce cas particulier est la preuve d'anomalies de réabsorption tubulaire multiples. Ces indices peuvent aider à la localisation exacte de

l'atteinte au sein du tubule bien que dans la majeure partie des cas la protéinurie soit la seule anomalie identifiée.

- Recommandations pour le traitement et le suivi de la protéinurie :

Il est recommandé de :

- Mettre en place un suivi des chiens non azotémiques présentant une protéinurie rénale persistante et un RPCU supérieur à 0,5.
- Explorer la cause de protéinurie (et traiter la potentielle affection sous-jacente associée) dans le cas de chiens non azotémiques présentant une protéinurie rénale persistante et un RPCU supérieur à 1,0.
- Jusqu'à très récemment il était recommandé de traiter la protéinurie de chiens souffrant de maladie rénale chronique en stades 2, 3 et 4 IRIS présentant un RPCU supérieur à 0,5, ainsi que les chiens en stade 1 IRIS avec un RPCU supérieur à 2,0 [31]. Or de nouvelles recommandations internationales, établies par un consensus d'expert, ont été publiées très récemment. Il est désormais recommandé de traiter les chiens souffrant de glomérulopathie dès que le RPCU excède la valeur de 0,5, et ce quelle que soit la valeur de la créatininémie [106].
- Évaluer la protéinurie tous les 6 mois chez un animal présenté pour une maladie rénale chronique compliquée d'une protéinurie rénale [31]. Il faut toutefois garder en mémoire qu'en toute fin d'évolution d'une maladie rénale, il est classique d'observer une diminution de la protéinurie du fait de la diminution de la masse néphronique.

Par ailleurs, d'après les données disponibles concernant les variations journalières du RPCU chez des chiens présentant une protéinurie stable [55], on considère qu'il faut une variation d'au moins 40% par rapport à la valeur basale (spécialement dans le cas de protéinuries faibles) pour conclure avec un fort degré de certitude à une modification significative du RPCU (augmentation ou diminution) [31]. Cette étude s'est appuyée sur la détermination du RCV (reference change value), reflétant par définition la part de variabilité pouvant être attribuée à la variabilité intra-individuelle et analytique. Défini comme la différence statistiquement significative entre 2 résultats obtenus consécutivement sur un individu, il permet de déterminer si l'augmentation ou la diminution du RPCU peut être considérée comme significative ou liée à la variation biologique.



Cette valeur de  $\pm 40\%$  par rapport à une valeur basale du RPCU ne peut être utilisée qu'à condition que l'animal présente une protéinurie stable dans le cadre d'un suivi de maladie rénale chronique et peut ainsi servir à évaluer l'efficacité d'un traitement anti-protéinurique par exemple.

#### 4.2. Intérêt clinique de l'évaluation quantitative de la protéinurie via le RPCU

La mesure du RPCU présente un intérêt diagnostique certain mais aussi pronostique. En effet, la protéinurie est un facteur de risque important dans le cadre de la progression d'une maladie rénale chronique chez l'homme. Elle est aussi étroitement corrélée à la progression de maladies rénales chez les chiens et les chats [107–109]. Des données récentes indiquent qu'une protéinurie isolée augmente le risque de mortalité, notamment chez des chats conservant par ailleurs une bonne fonction rénale (c'est-à-dire sans que la capacité de concentration des urines ne soit affectée et avant l'apparition d'azotémie) [31]. C'est pourquoi la diminution de la protéinurie est considérée comme un objectif thérapeutique en soi [110–112].

Des études en médecine humaine ont montré qu'une réduction significative de la protéinurie est associée à un ralentissement de la progression de la maladie rénale chronique [110,113,114]. Mais les preuves manquent en ce qui concerne les maladies rénales chroniques chez le chien et le chat [57,115,116]. Chez des chiens insuffisants rénaux chroniques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine permettent une diminution de la protéinurie et un ralentissement de la progression de la maladie, associés à une augmentation de la durée de vie [57].

Le rôle joué par la protéinurie dans la progression de la maladie rénale est encore incertain, spécialement chez le chien et le chat [31]. *A priori*, elle ne serait pas seulement un marqueur de progression de la maladie rénale mais contribuerait à l'aggravation de la maladie en étant responsable de lésions glomérulaires et tubulaires, conduisant ainsi à une perte progressive de néphrons [117–121]. En effet, le passage anormal de protéines à travers la barrière de filtration glomérulaire et le tissu mésangial est susceptible de stimuler la production de matrice mésangiale, ce qui peut induire une inflammation interstitielle voire conduire à une fibrose du tubule par le biais de plusieurs mécanismes dont l'activation du complément, la

production de facteurs de croissance, de produits vasoactifs et l'induction de cytokines pro-inflammatoires [101,122,123].

De plus, il a été démontré que la transferrine, les protéines du complément [124,125] ainsi que les lipoprotéines [126] ont une toxicité directe sur les cellules tubulaires proximales rénales. Cette toxicité intrinsèque serait au moins en partie liée à leur accumulation dans le cytoplasme des cellules tubulaires proximales au cours du processus de réabsorption tubulaire [121]. D'une part, ces protéines activent les gènes codant pour des substances vaso-actives et inflammatoires (notamment endothélines, chémokines et cytokines) [119,121]. D'autre part, le dépassement des capacités lysosomiales pourrait induire la libération d'enzymes intracellulaires cytotoxiques. De plus, une augmentation de la concentration urinaire en ammoniac (liée au métabolisme protéique accru) serait susceptible d'activer le complément [126]. Ce mécanisme de toxicité propre des protéinuries pourrait expliquer en partie le caractère pronostique défavorable de la protéinurie.



# **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

## **1. Matériel et méthodes**

### 1.1. Schéma expérimental

Cette étude prospective a été menée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) entre Février et Juillet 2012 avec pour objectif de comparer les résultats de mesure du RPCU à partir de spécimens recueillis sur papier absorbant à ceux obtenus avec la méthode standard, c'est-à-dire sur le surnageant urinaire liquide.

Ainsi, pour chacun des spécimens étudiés, le RPCU a été déterminé :

1/ En double sur urine liquide par la technique habituelle du laboratoire afin de servir de base de comparaison (le résultat obtenu étant par la suite identifiée comme « RPCU liquide » ou « Liquide »).

2/ A partir de spécimens d'urines collectés sur papier absorbant dans différentes conditions et à des échéances variables afin de vérifier si cette méthode est compatible avec un envoi postal dans le cadre d'une utilisation en routine.

L'étude a été menée en 4 phases :

1/ Un essai préliminaire visant à tester :

- Deux natures et trois volumes différents de solvants lors de la préparation des spécimens papiers.
- Si la valeur du RPCU mesuré sur papier absorbant présentait des différences significatives avec la mesure obtenue par la méthode classique.
- La stabilité du RPCU mesuré à partir des spécimens papiers pendant 3 jours.

2/ Une étude de comparaison dans une population de chiens sains et protéinuriques.

La stabilité du RPCU sur spécimen papier a aussi été suivie jusqu'à 15 jours après séchage. Ce délai a ensuite été ramené à 5 jours après analyse des premiers résultats.

3/ Une simulation des conditions de prélèvement d'un propriétaire à son domicile : les spécimens sur papier absorbant étaient préparés non par dépôt d'une quantité précise prédéfinie d'urine mais par trempage du papier directement dans l'urine.

4/ Une étude de répétabilité et de reproductibilité de la méthode sur 5 jours où chaque mesure était répétée 3 fois, chaque papier étant préparé en 3 exemplaires.

## 1.2. Les animaux – Critères d'inclusion et d'exclusion

La présente étude a été menée sur des chiens présents sur le site de l'ENVT entre Février et Juillet 2012, avec le consentement éclairé des propriétaires (Annexe n°2). Ces animaux étaient présentés aux cliniques de l'ENVT pour une consultation ou une hospitalisation, appartenaient au service de physiologie de l'ENVT ou encore à des étudiants résidant sur le campus de l'ENVT.

Les spécimens ont été inclus dans l'étude indépendamment de l'âge, du sexe, de la race ou de l'état de santé de l'animal. Le seul critère d'inclusion a été un volume recueilli suffisant (supérieur ou égal à 3,0 mL) permettant de réaliser toutes les analyses nécessaires. Les spécimens présentant un aspect macroscopiquement très modifié (couleur, turbidité) pouvant interférer avec la méthode de dosage ont été exclus.

## 1.3. Collecte et traitement des spécimens urinaires

Les urines ont été recueillies par miction spontanée au cours d'une promenade en laisse, dans des barquettes en plastique, puis immédiatement conditionnées dans des pots réservés à cet usage. Chaque animal a été prélevé au maximum 2 fois, les prélèvements étant alors espacés d'au moins 24 heures.

Chaque spécimen récolté était réparti en :

- Un volume de 1,0 mL d'urine placé dans un tube Eppendorf (tube de 1,5 mL, Safe-Lock Eppendorf, Le Pecq, France) pour la détermination du RPCU sur urine liquide
- Le reste dans un tube sec en plastique (tube à hémolyse bouché en polystyrène et fond rond, 75 x 13mm, 4 mL, Gosselin, Borre, France) pour la préparation des spécimens papier absorbant.

Lors du recueil des urines, les informations suivantes ont été notées : race, sexe et âge. Les spécimens ont été identifiés avec un marqueur ineffaçable dans l'ordre chronologique de collecte de la façon suivante : « de U1 à UX ». Seul le numéro de l'étude a figuré sur les tubes et donc sur les résultats d'analyses.

#### 1.4. Etapes pré-analytiques

##### 1.4.1. Préparation des spécimens sur papier absorbant

Cette préparation a systématiquement été réalisée pour chaque spécimen dans l'heure suivant le prélèvement. Des carrés de papier absorbant à usage domestique (type Sopalin) d'environ 4,5 x 4,5 cm ont été utilisés (rouleaux neufs, visuellement propres). Ils ont chacun été déposés sur une plaque de verre pour recevoir un dépôt de 200 µL d'urine à l'exception de ceux qui étaient trempés dans l'essai /3.

##### 1.4.2. Traitement et conservation des spécimens

Les aliquotes liquides ont été conservées à température ambiante (20°C environ) et analysées dans un délai maximal de 4 heures après le prélèvement. Les spécimens sur papier absorbant, une fois séchés à température ambiante à l'abri des courants d'air (2 heures en moyenne), ont été conservés dans des enveloppes en papier identifiées (« UX-Date de prélèvement »).

###### *1.4.2.1. Spécimens urines liquides*

Immédiatement après avoir réalisé le prélèvement, le tube Eppendorf a été centrifugé à ~4000 g pendant 5 minutes (Rotofix 32A, Andreas Hettich GmbH and Co., Tuttlingen, Allemagne). Les mesures du RPCU sur spécimens liquides ont immédiatement été réalisées sur le surnageant urinaire (analyse en duplicata pour chaque spécimen).

###### *1.4.2.2. Spécimens sur papier absorbant*

Chaque papier a été coupé en petits morceaux avec des ciseaux réservés à cet usage, puis introduit dans un tube Eppendorf identifié selon la procédure évoquée en 3.a. Un volume de 0,5 mL d'eau distillée a été ajouté (dans l'essai préliminaire nous avons également utilisé une solution de NaCl à 9 g/L). Le tube a ensuite été agité au Vortex (Heidolph Top Mix 94323, Biobloch scientific) pendant 30 secondes puis laissé à température ambiante pendant environ

10 minutes. Pour finir, le tube a été centrifugé pendant 5 min à ~4000 g et les analyses ultérieures ont été effectuées sur le surnageant.

## 1.5. Etapes analytiques

Les instruments, le lot de réactifs utilisés ainsi que la compétence des techniciens de laboratoire sont des sources classiques de variabilité lors de diagnostics en laboratoire. C'est pourquoi une seule et même personne a réalisé toutes ces analyses (CN) avec le même lot de réactifs pour toute l'étude.

Les réactifs ont été stockés à 4°C conformément aux données du fabricant et protégés de la lumière lorsqu'ils n'étaient pas utilisés, restant ainsi *a priori* stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

### 1.5.1. Analyses préliminaires des urines

#### 1.5.1.1. *Evaluation des critères macroscopiques*

Les critères macroscopiques suivants ont été notés : le volume d'urine, la couleur et la turbidité de l'urine centrifugée.

#### 1.5.1.2. *Mesure de la densité urinaire et analyse par bandelette urinaire*

Avant la mesure du RPCU, sur chaque urine liquide ont été réalisées :

- Une mesure de la densité urinaire à l'aide d'un réfractomètre optique Atago T2-NE (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japon). Avant chaque série de mesures, la calibration du réfractomètre a été effectuée avec de l'eau distillée de densité égale à 1,000 et corrigée si nécessaire avec la vis située à l'avant de l'oculaire. Ensuite, une goutte d'urine était déposée sur le prisme du réfractomètre et la densité était relevée sur la plage de lecture correspondante. Toutes les mesures ont été réalisées à la température du laboratoire (environ 20°C).
- Une analyse par bandelette urinaire, avec analyse cytologique du culot urinaire si une anomalie était mise en évidence afin d'écartier une affection post-rénale susceptible d'interférer sur la stabilité des spécimens sur papier (comme une Inflammation du Tractus Urinaire avec bactériurie notamment). L'analyse par bandelette urinaire (Combur 10 test®, Roche Diagnostics France) a été réalisée par dépôt d'urine au compte-gouttes et non par trempage afin d'économiser le volume initial du spécimen.

L'ensemble de ces résultats a été consigné avec la date et l'heure de l'analyse dans une feuille au nom de l'animal.

#### 1.5.2. Technique de détermination de la créatinine et des protéines urinaires

Le RPCU a été calculé à partir des concentrations des deux analytes. La méthode est décrite dans la feuille technique correspondante à partir du surnageant urinaire ; elle utilise un analyseur de transfert (K.Bio 2, Kitvia, Labarthe Inard, France) et des réactifs spécifiques (Protein u&csf et Creatinine monoreactif liquide stable PAE, Kitvia, Labarthe Inard, France, Annexes 3 et 4).

##### 1.5.2.1. *Dosage de la créatinine urinaire*

La méthode utilisée dans cette étude repose sur la réaction de Jaffé dont le principe général consiste à mesurer par spectrophotométrie, à 510 nm, l'intensité de la coloration du complexe rouge-orangé formé par la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin, la vitesse de formation de la coloration étant proportionnelle à la concentration en créatinine dans le spécimen (cf § 3.2).

##### 1.5.2.2. *Dosage des protéines urinaires*

La méthode utilisée, colorimétrique, est celle du rouge de Pyrogallol qui combiné au molybdate de sodium forme avec les protéines un complexe coloré rouge qui en milieu acide absorbe à 600 nm, proportionnellement à la concentration en protéines dans le spécimen (cf § 3.1).

#### 1.5.3. Calibration de l'analyseur et Contrôle de qualité

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

Avant chaque série de mesures, l'analyseur a été contrôlé pour les deux analytes selon le protocole de routine de laboratoire avec une urine de contrôle humaine (Liquidcheck Urine Chemistry Control, Bio-Rad \_ Level 1, Bio RAD Laboratories, Marnes-la-Coquette, France, Annexe 5). Il s'agit d'urines de contrôle bovines. Nous n'avons pu avoir davantage de



renseignements sur la composition auprès du laboratoire fabricant BioRad, sous couvert du secret de fabrication.

Si une ou plusieurs mesures de contrôle se trouvaient en dehors des cibles fournies par le fabricant, les diverses opérations correctrices prévues par le fabricant ont été mises en œuvre pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème et obtention des résultats de contrôles dans les valeurs cibles. La température du laboratoire, susceptible d'avoir un effet sur les réactions chimiques mises en jeu, a aussi été suivie.

## 1.6. Protocole expérimental

### 1.6.1. Essai préliminaire

14 chiens ont été prélevés et chaque spécimen récolté a subi les opérations suivantes :

1/ Analyse de chaque spécimen d'urine avec la méthode de référence en duplicata (cf § 1.4.2.1).

2/ Préparation de 4 papiers urine.

3/ Analyse des papiers à J0 (immédiatement après séchage), J1 (24 heures après séchage), J2 (48 heures après séchage) et J3 (72 heures après séchage).

De plus, deux types de solvants (eau distillée et NaCl 0,9%) ainsi que différents volumes pour chacun de ces solvants (0,5 mL, 1,0 mL et 1,5 mL) ont été testés sur 7 spécimens en suivant la procédure suivante pour chacun :

1/ Analyse de chaque spécimen d'urine avec la méthode de référence en duplicata.

2/ Préparation de 6 papiers avec respectivement pour solvant soit de l'eau distillée, soit du NaCl 0,9% et un volume variable de chacun des solvants (0,5 mL ; 1,0 mL ; 1,5 mL).

3/ Analyse des papiers à J0 (immédiatement après séchage).

### 1.6.2. Comparaison des valeurs de RPCU dans une population de chiens sains et de chiens protéinuriques

Cette étude a porté sur 62 spécimens dont 57 présentaient un RPCU inférieur à 0,2, et 5 spécimens un RPCU supérieur ou égal à 0,2. Cette partie de l'étude a été menée en deux étapes.

Dans un premier temps, les opérations suivantes ont été réalisées sur chacun des spécimens obtenus :

- 1/ Analyse de chaque spécimen d'urine avec la méthode de référence en duplicata.
- 2/ Préparation de 6 papiers urine pour chacun des spécimens récoltés.
- 3/ Analyse des papiers à J0, J1, J2, J3, J4, J5, J7 et J15.

Dans la seconde partie, le même protocole a été suivi mais les analyses de papiers après séchage ont été ramenées à J5, ce délai étant suffisant pour permettre un envoi postal du papier absorbant par le propriétaire demandeur de l'analyse, et les résultats ayant montré que la stabilité du RPCU étant fortement compromise passé ce délai.

#### 1.6.3. Simulation des conditions de prélèvements d'un propriétaire à son domicile

Des urines de 25 chiens ont été récoltées et les opérations suivantes ont été réalisées pour chaque spécimen :

- 1/ Analyse de chaque spécimen d'urine avec la méthode de référence en duplicata.
- 2/ Préparation de 6 papiers urine obtenus par trempage dans l'urine.
- 3/ Analyse des papiers à J0, J1, J2, J3, J4 et J5.

#### 1.6.4. Répétabilité et reproductibilité

Des urines de 30 chiens ont été récoltées et les opérations suivantes ont été effectuées pour chaque spécimen :

- 1/ Analyse de chaque spécimen d'urine avec la méthode de référence en duplicata.
- 2/ Préparation de 3 papiers pour chaque temps d'analyse (soit 18 papiers).
- 3/ Analyse répétées trois fois de chacun des papiers à J0, J1, J2, J3, J4 et J5.

### 1.7. Analyse des données

Tous les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur les spécimens liquides. Les comparaisons de méthodes ont été effectuées par calcul du coefficient de corrélation de Pearson, l'étude d'agrément selon Passing-Bablok et diagrammes des différences de Bland-Altman, comme recommandé [127]. Les éventuels effets de covariables (temps par exemple) ont été étudiés par analyse de variance. Les calculs ont été effectués avec un tableur Excel ainsi qu'ANALYZE-IT® et SYSTAT®. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05 ( $p < 0,05$ ).

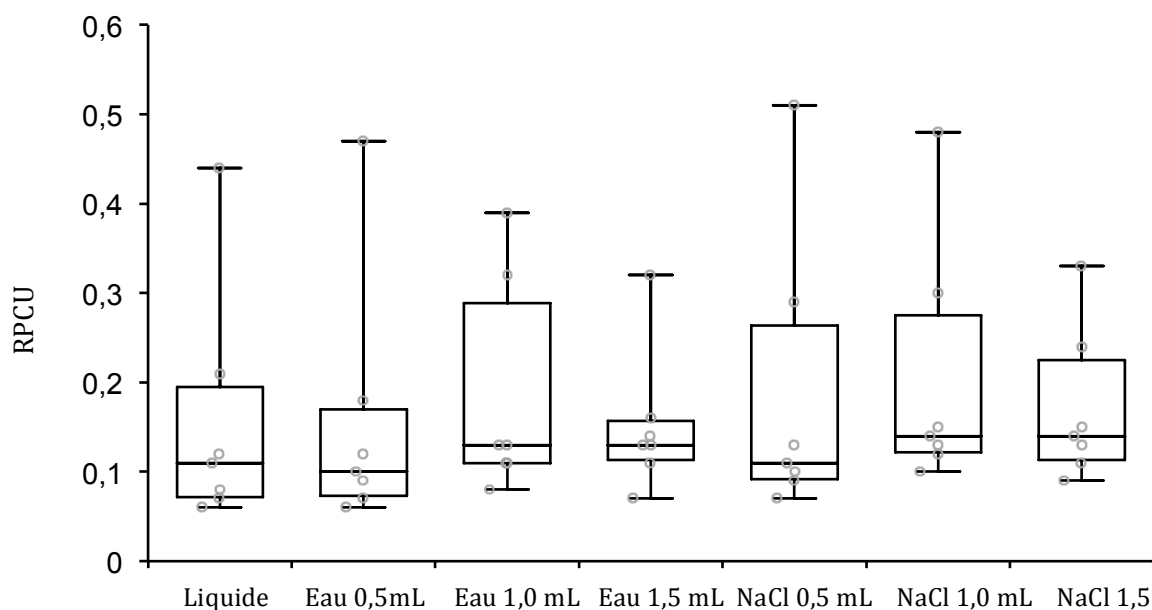
## 2. Résultats

### 2.1. Essai préliminaire

#### 2.1.1. Nature et volume de solvants

La figure 1 représente la distribution des RPCU sur spécimens papiers immédiatement après séchage (J0) obtenus avec 2 solvants différents (eau distillée et NaCl 0,9%) et 3 volumes distincts (0,5 mL ; 1,0 mL ; 1,5 mL) avec pour base de comparaison les valeurs obtenues par la méthode de référence (Liquide).

La nature et le volume de solvants utilisés pour la préparation des spécimens papier n'a pas eu d'effet significatif sur les valeurs de RPCU obtenues à J0 (ANOVA  $P > 0,05$ ) (Figure 1).



**Figure 1** : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir de spécimens papiers analysés avec 2 solvants et 3 volumes différents (Eau 0,5 mL ; Eau 1,0 mL ; Eau 1,5 mL ; NaCl 0,5 mL ; NaCl 1,0 mL ; NaCl 1,5 mL).

Les coefficients de corrélation de Pearson  $r$  avec les urines liquides ont tous été supérieurs à 0,9. L'étude d'agrément selon Passing-Bablok montre des valeurs des ordonnées à l'origine proches de zéro (biais constant nul) et une pente proche de 1 (mais un intervalle de confiance associé large) (Tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des résultats obtenus sur spécimens papiers à J0 (immédiatement après séchage) pour les 2 solvants (eau distillée et NaCl 0,9%) et pour respectivement 3 volumes distincts (0,5 mL, 1,0 mL et 1,5 mL) (n : nombre de spécimens ; r : coefficient de corrélation de Pearson ; a et b, paramètres de l'équation de Passing Bablok :  $y = ax + b$  ; [IC à 95%]).

	Eau 0,5 mL	Eau 1,0 mL	Eau 1,5 mL	NaCl 0,5 mL	NaCl 1,0 mL	NaCl 1,5 mL
n	7	7	7	7	7	7
r	0,99 [0,96;1,00]	0,94 [0,63;0,99]	0,97 [0,83;1,00]	0,99 [0,94;1,00]	0,99 [0,93;1,00]	0,98 [0,84;1,00]
a	1,00 [0,75;1,26]	0,81 [0,4;1,62]	0,58 [0,25;1,2]	1,16 [0,8;1,78]	1,00 [0,6;1,5]	0,85 [0,56;1,00]
b	0,00 [-0,03;0,02]	0,04 [-0,02;0,08]	0,07 [0,00;0,11]	0,00 [-0,08;0,03]	0,04 [-0,01;0,08]	0,05 [0,03;0,08]

Finalement, tous les résultats étant comparables, pour des raisons pratiques, nous avons choisi d'utiliser 0,5 mL d'eau distillée pour préparer les spécimens papiers.

### 2.1.2. Essai préliminaire de stabilité sur 3 jours

Aucune analyse n'a été réalisée à J0. Prélever les spécimens, effectuer la totalité des analyses préliminaires tout en se familiarisant avec l'analyseur et enfin analyser les spécimens d'urines liquides avec la méthode de référence a pris plus de temps que prévu, ne permettant pas d'analyser les papiers à J0 immédiatement après séchage.

9 spécimens papiers ont été exclus de la série à J2 par manque de données suite à un problème de séchage (les 9 papiers manquants étant tombés au sol avant l'analyse à J2 à cause de la ventilation). Le site de séchage des papiers a par la suite été changé.

La figure 2 représente l'évolution du RPCU sur spécimens papiers après séchage (à J1, J2 et J3) avec pour base de comparaison la valeur obtenue par la méthode de référence (Liquide).

Aucune différence significative du RPCU entre les deux méthodes d'analyse après le séchage n'a été observée (ANOVA,  $P > 0,05$ ) (Figure 2).

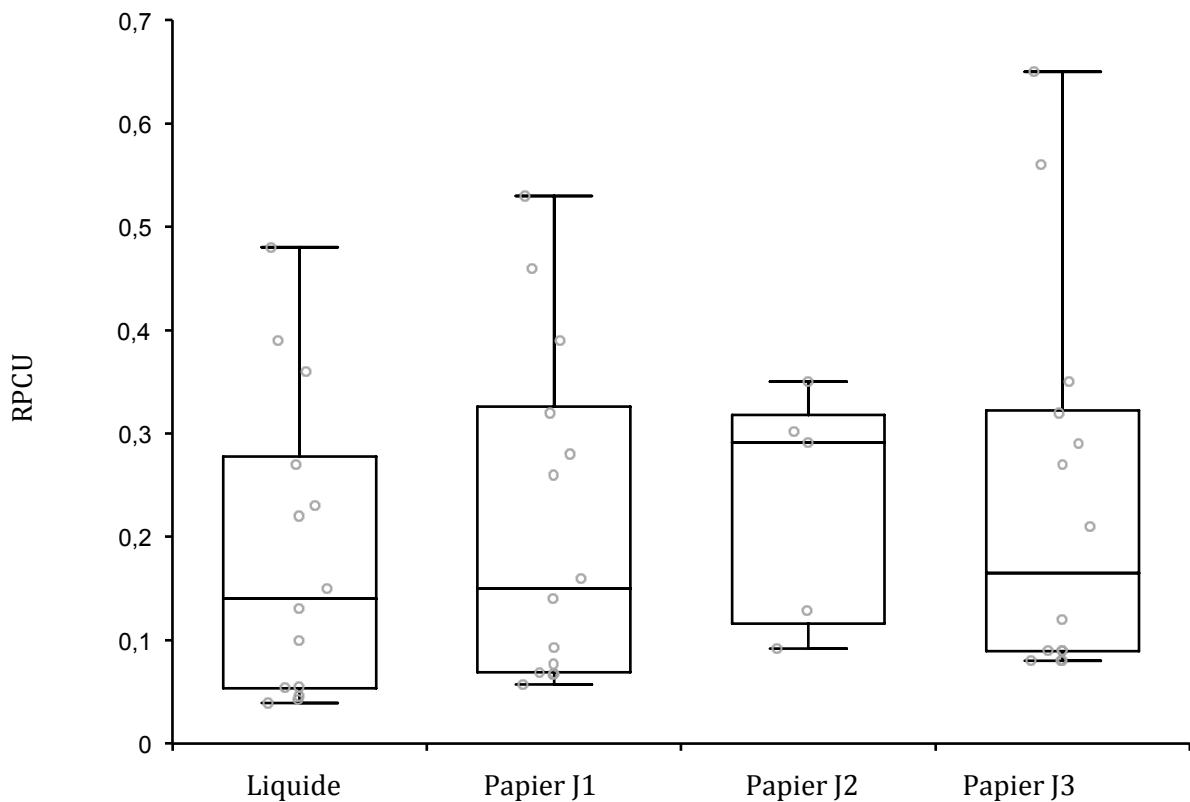


Figure 2 : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir de spécimens papiers analysés à J1, J2 et J3.

Une analyse individuelle des résultats confirme que les variations sont minimales et ne changent pratiquement pas la classification clinique des résultats aux seuils classiques de 0,2 et 0,5.

## 2.2. Comparaison des valeurs de RPCU dans une population de chiens sains et de chiens protéinuriques

Aucune variation significative du RPCU n'a été observée sur les spécimens papiers en fonction du temps après le séchage, ni par comparaison à la méthode de référence (ANOVA,  $P > 0,05$ ) (Figure 3).

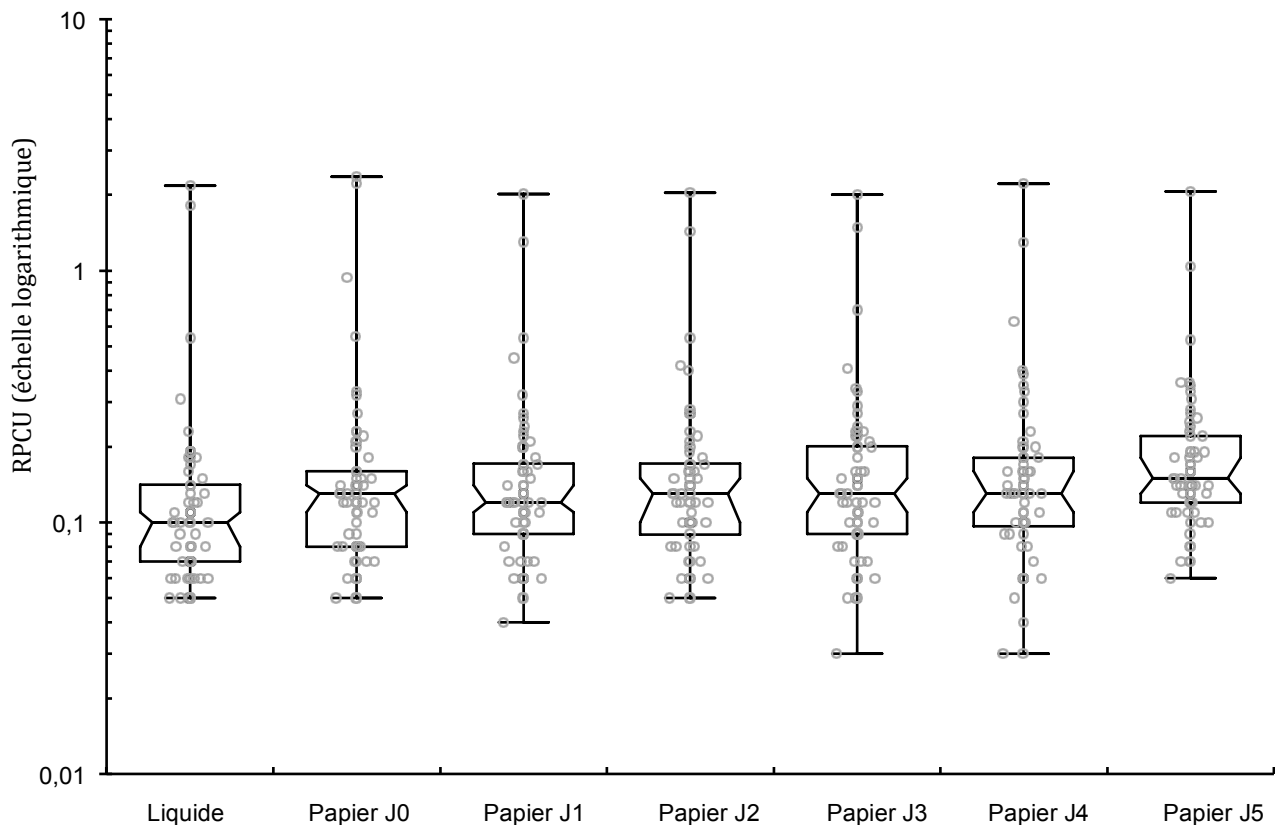
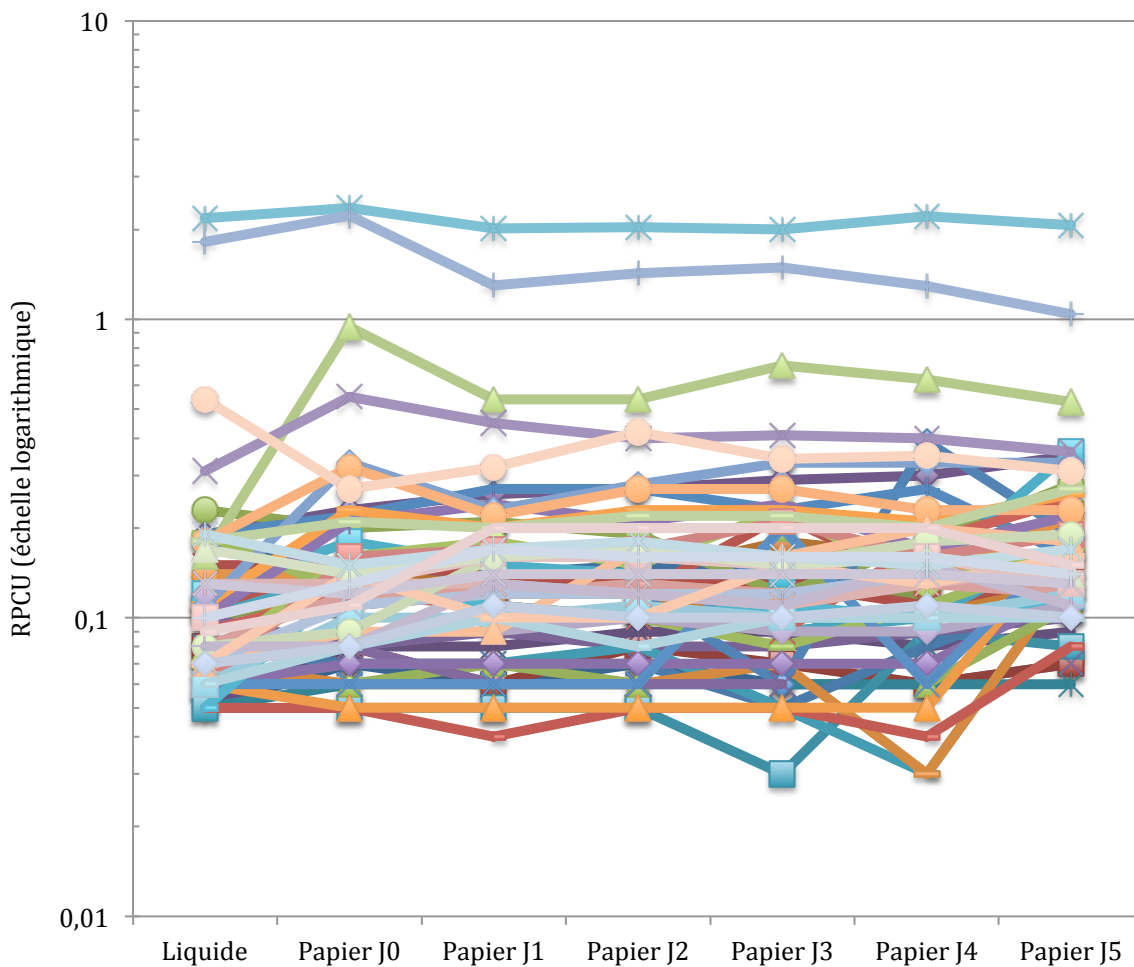


Figure 3 : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir des spécimens papiers analysés à J0, J1, J2, J3, J4 et J5.

La figure 4 représente l'évolution du RPCU de chaque spécimen papier après le séchage confirmant l'absence d'effet mais montrant quelques variations intra-individuelles.

Les résultats d'un spécimen à J0 et d'un autre à J4 ont été retirés (valeurs aberrantes).



**Figure 4 :** Évolution des RPCU individuels obtenus à partir des spécimens papiers à différents moments post-séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5) comparés au RPCU obtenu par la méthode de référence (Liquide) sur 62 animaux.

Les coefficients de corrélation de Pearson sont supérieurs à 0,9 (Tableau 4).

Aucun biais (constant et proportionnel) n'a pu être mis en évidence par l'étude d'agrément selon Passing-Bablok aux différents temps d'analyses des spécimens papiers, comparés à la méthode de référence sur spécimens liquides (Tableau 4). Cependant plusieurs points d'analyse sont douteux :

- À J0 : une pente égale à 1,21 ; IC à 95 % = [1,00 ; 1,5].
- À J3 : une pente égale à 1,42 ; IC à 95 % = [1,00 ; 2,00].
- À J4 : une pente égale à 1,36 ; IC à 95 % = [1,00 ; 2,00].

Tableau 4: Comparaison des résultats obtenus sur spécimens papiers de J0 à J5 à ceux obtenus sur spécimens liquides par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson et l'étude d'agrément selon Passing-Bablok (n : nombre de spécimens ; r : coefficient de corrélation de Pearson ; a et b, paramètres de l'équation de Passing Bablok :  $y = ax + b$  ; [IC à 95%]).

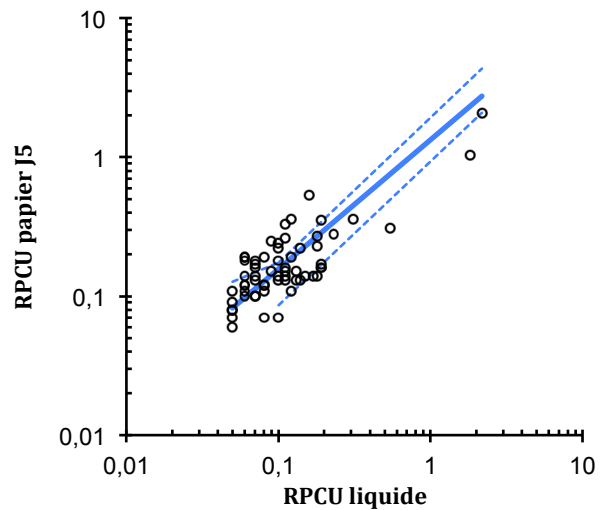
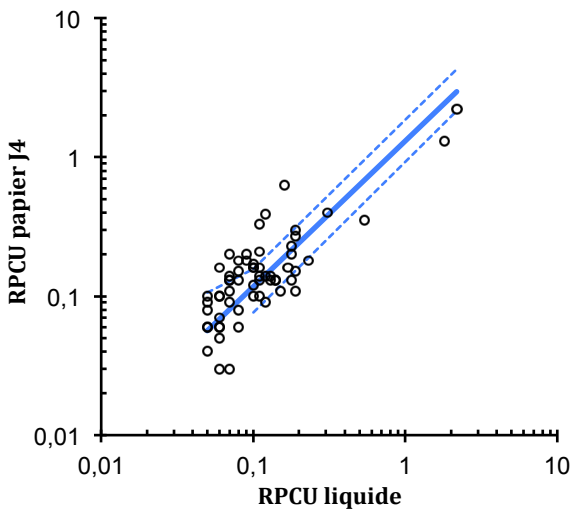
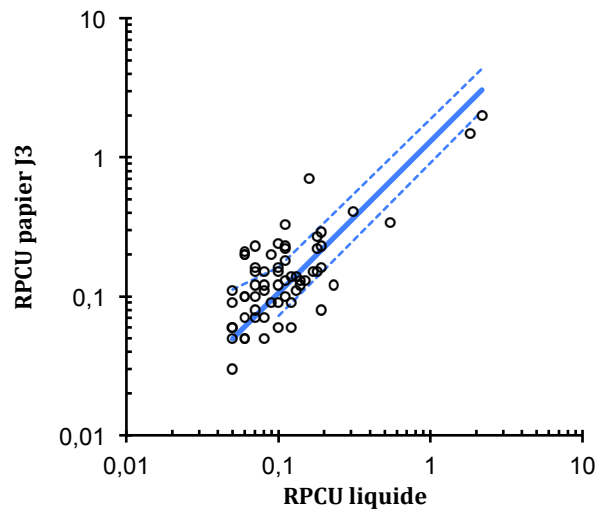
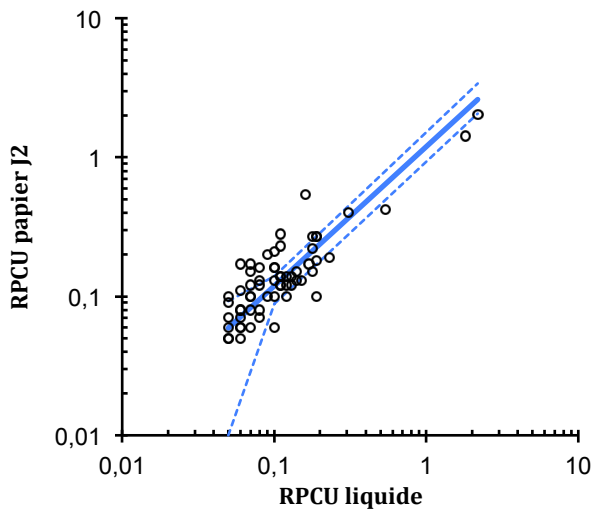
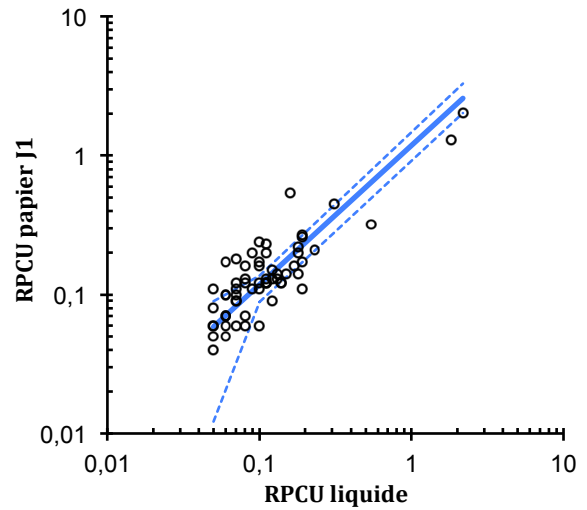
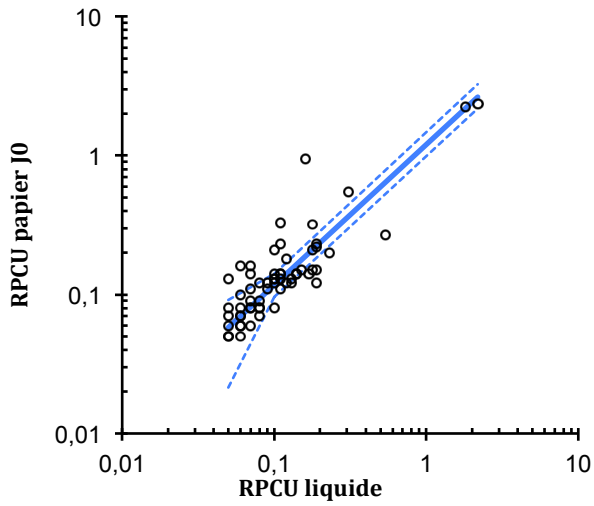
	J0	J1	J2	J3	J4	J5
n	61	62	62	62	61	62
r	0,95 [0,93;0,97]	0,96 [0,94;0,98]	0,97 [0,95;0,98]	0,95 [0,92;0,97]	0,95 [0,91;0,97]	0,93 [0,89;0,96]
a	1,21 [1,00;1,5]	1,18 [0,93;1,52]	1,2 [0,95;1,57]	1,42 [1,00;2,00]	1,36 [1,00;2,00]	1,26 [0,96;2,00]
b	0,00 [-0,03;0,02]	0,00 [-0,03;0,02]	0,00 [-0,03;0,02]	-0,02 [-0,07;0,02]	-0,01 [-0,06;0,02]	0,02 [-0,04;0,05]

Les figures 5 à 10 représentent les régressions de Passing-Bablok et confirment que l'agrément entre spécimen liquide et spécimens papiers présente une certaine imprécision.

D'autre part, l'analyse des diagrammes de Bland-Altman (Figures 11 à 16) montre :

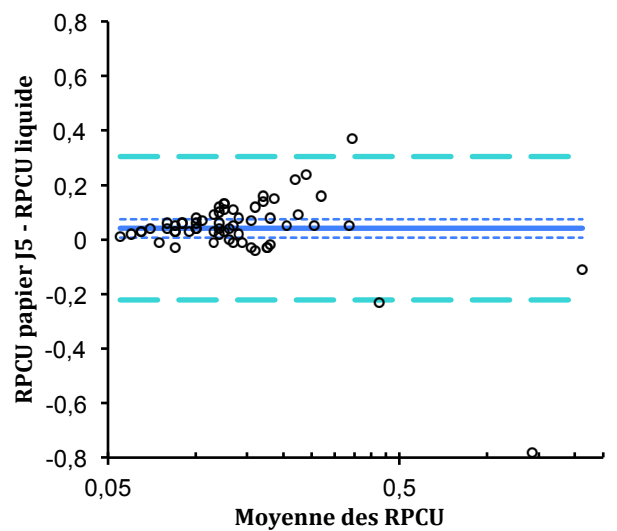
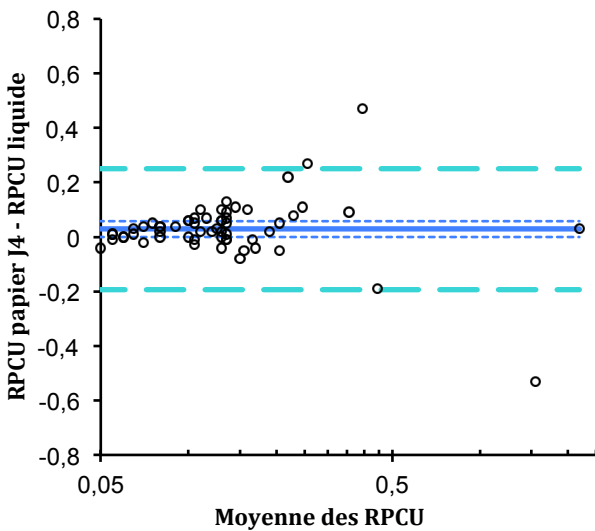
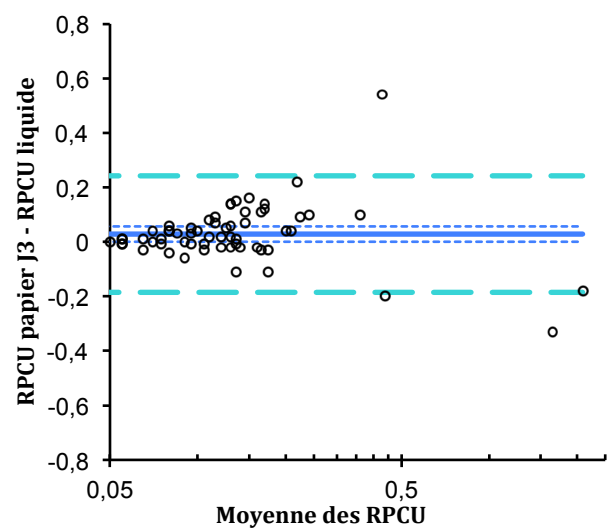
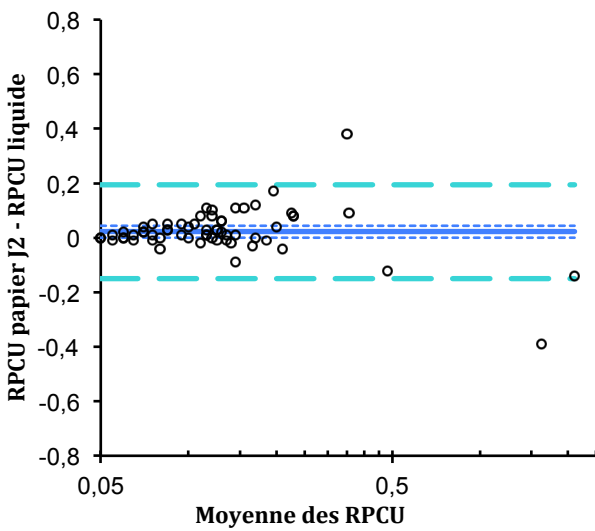
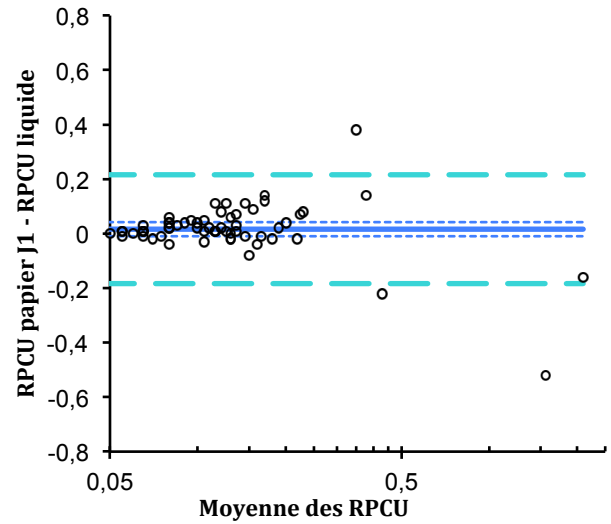
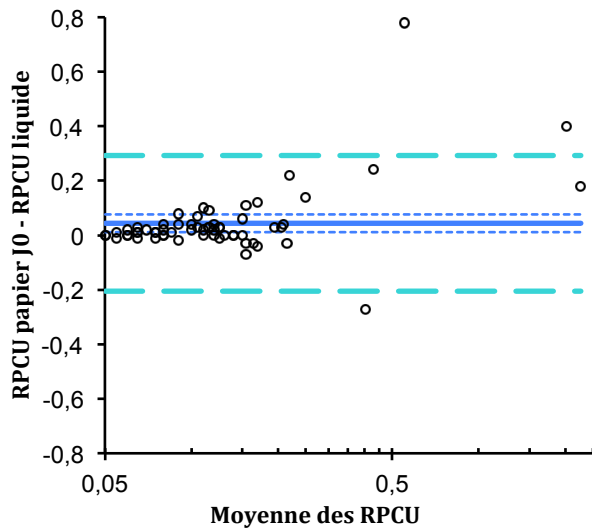
- Une faible surestimation du RPCU à partir de spécimens papiers.
- Des écarts plus importants à partir de  $\text{RPCU} = 0,4$  à  $0,5$ .





Figures 5 à 10 (de gauche à droite et de haut en bas) : **Régression de Passing-Bablok** : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5).

La ligne pleine épaisse représente la droite de régression, les deux lignes en pointillés l'intervalle de confiance de la régression et la ligne pleine fine la droite d'équation  $y=x$ .



Figures 11 à 16 (de gauche à droite et de haut en bas) : **Graphiques de Bland-Altman** : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5).

La ligne pleine représente la moyenne des différences avec son intervalle de confiance associé en pointillés courts, et les deux lignes en pointillés longs matérialisent les limites d'agrément supérieure et inférieure.

### 2.3. Simulation des conditions de prélèvements d'un propriétaire à son domicile

On n'observe pas de différence significative du RPCU après séchage dans les papiers en fonction du temps après le séchage, ni par comparaison à la méthode de référence (ANOVA,  $P > 0,05$ ) (Figure 17).

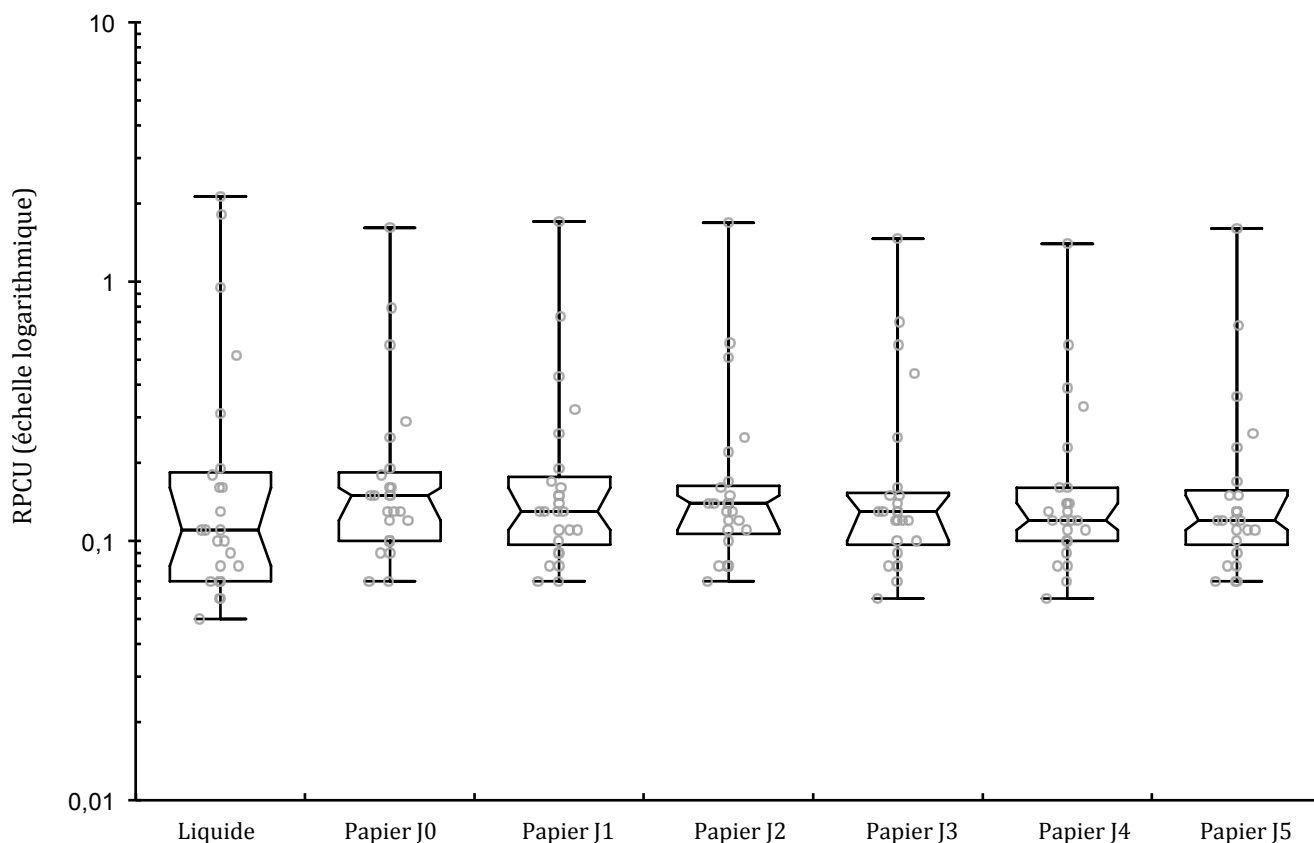


Figure 17 : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et à partir de spécimens papiers obtenus par trempage et analysés à J0, J1, J2, J3, J4 et J5.

L'analyse graphique des variations individuelles du RPCU sur spécimens papiers après séchage (à J0, J1, J2, J3, J4 et J5) avec pour base de comparaison la valeur obtenue par la méthode de référence (Liquide) montre une tendance (faible et non significative) à la diminution du RPCU sur les spécimens papiers aux différents moments d'analyse après séchage (Figure 18).

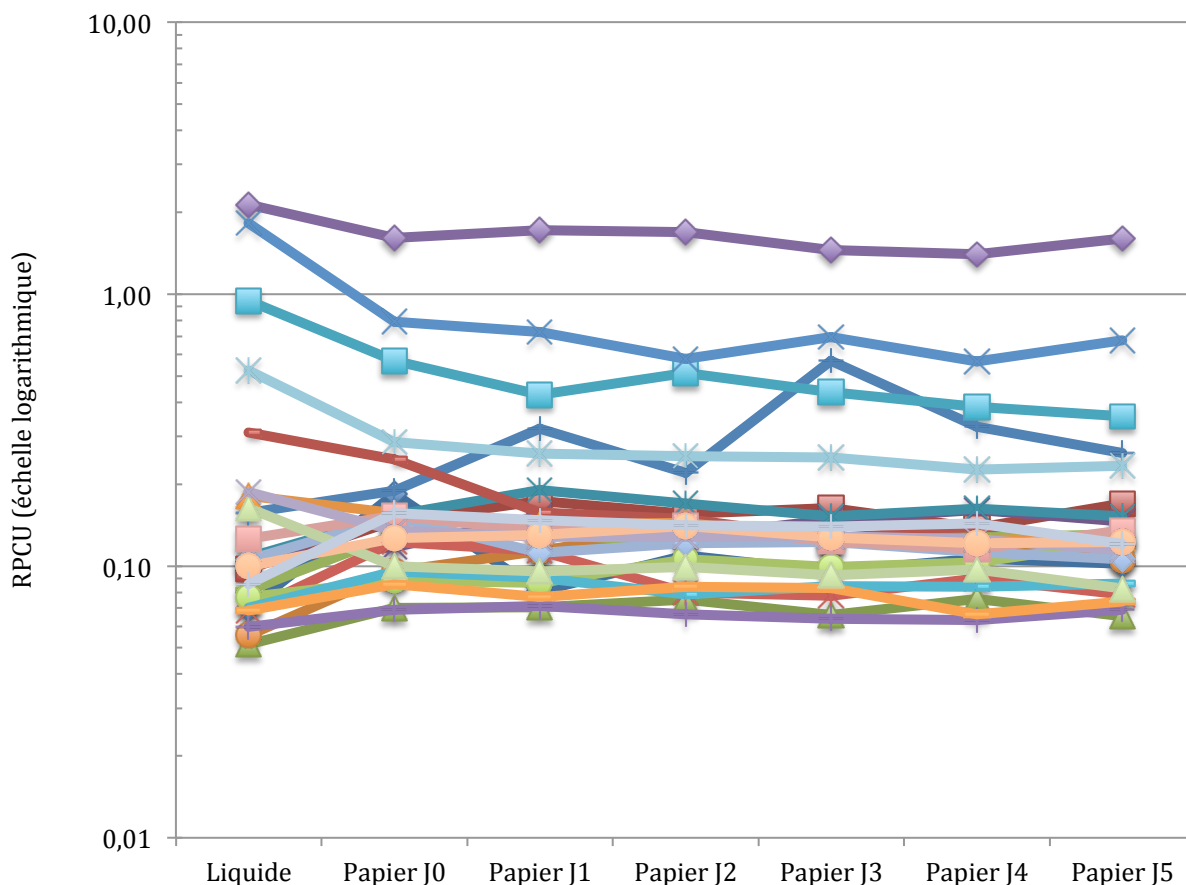


Figure 18 : Évolution des RPCU individuels obtenus à partir des spécimens papiers obtenus par trempage à différents moments post-séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5) comparés aux valeurs obtenues par la méthode de référence à partir des spécimens liquides (Liquide) sur 25 animaux.

Les coefficients de corrélation de Pearson sont tous supérieurs ou égaux à 0,9 (Tableau 5).

L'étude d'agrément selon Passing-Bablok (Figures 19 à 24, Tableau 5) montre :

- À J0 : un biais proportionnel (pente égale à 0,65 ; IC à 95% = [0,45 ; 0,8] et un biais constant (ordonnée à l'origine égale à 0,05 ; IC à 95% = [0,03 ; 0,08]).
- À J1 : un biais constant (ordonnée à l'origine égale à 0,04 ; IC à 95% = [0,01 ; 0,07]).
- À J2 : un biais constant (ordonnée à l'origine égale à 0,06 ; IC à 95% = [0,01 ; 0,08]).
- À J3 : un biais constant (ordonnée à l'origine égale à 0,06 ; IC à 95% = [0,01 ; 0,07]).
- À J4 : un biais proportionnel (pente égale à 0,5 ; IC à 95% = [0,29 ; 0,86]) et un biais constant (ordonnée à l'origine égale à 0,06 ; IC à 95% = [0,02 ; 0,08]).
- À J5 : un biais constant (ordonnée à l'origine égale à 0,06 ; IC à 95% = [0,01 ; 0,08]).

De plus, plusieurs points d'analyse sont douteux :

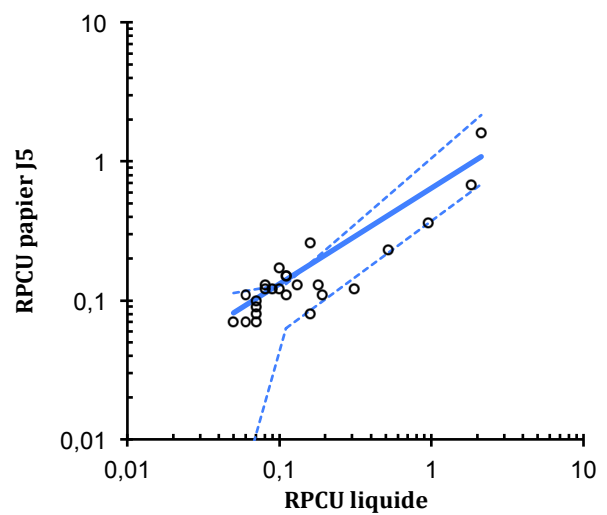
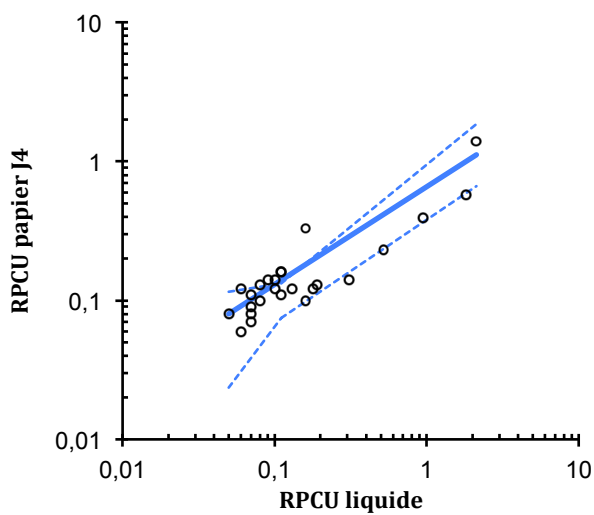
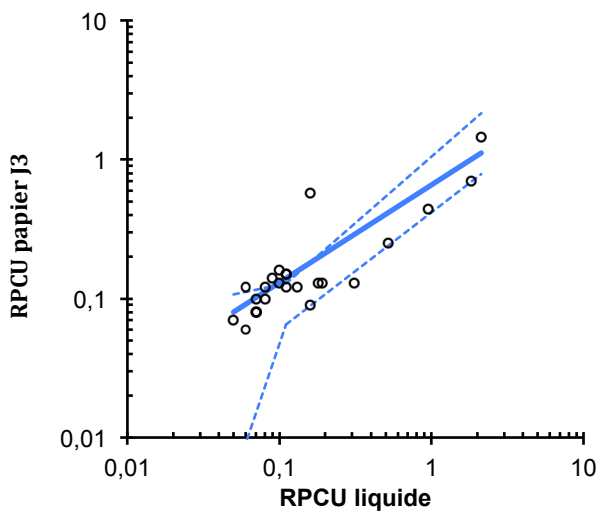
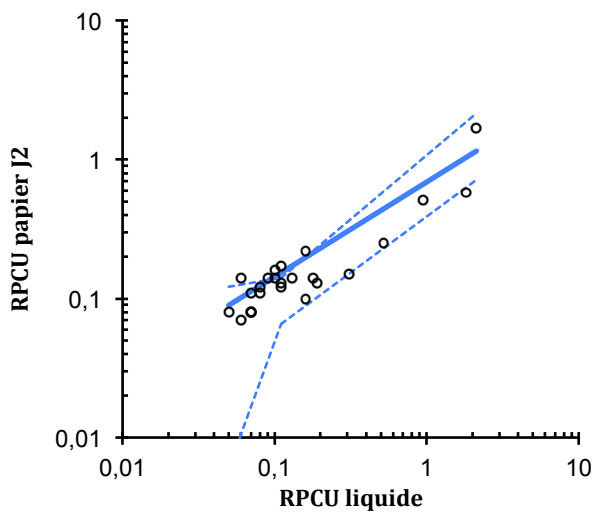
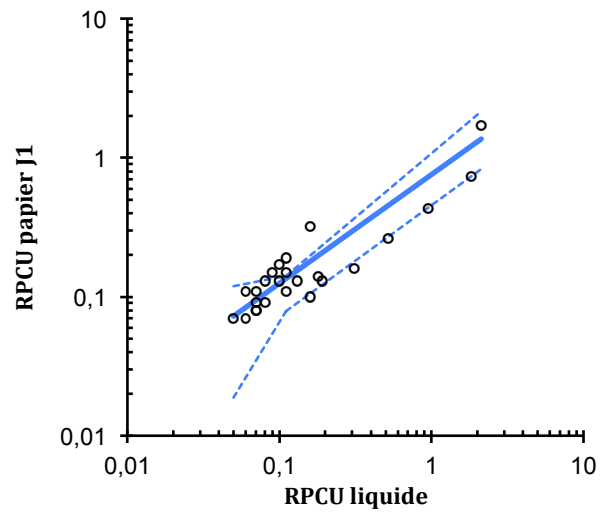
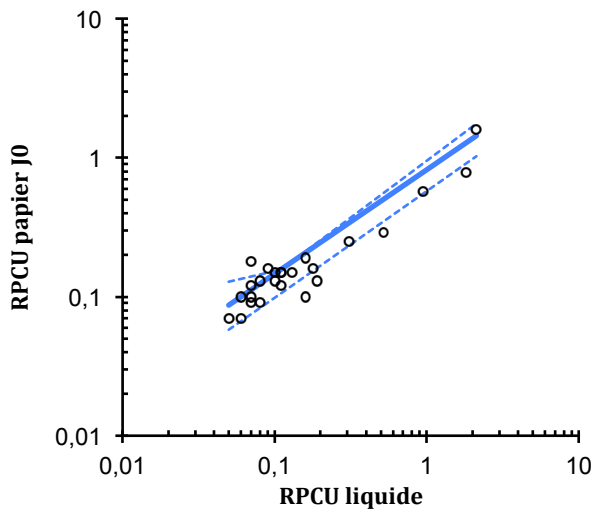
- À J1 : une pente égale à 0,63 ; IC à 95 % = [0,37 ; 1,00].
- À J2 : une pente égale à 0,51 ; IC à 95 % = [0,32 ; 1,00].
- À J3 : une pente égale à 0,5 ; IC à 95 % = [0,36 ; 1,00].
- À J5 : une pente égale à 0,48 ; IC à 95 % = [0,31 ; 1,00].

Tableau 5 : Comparaison des résultats obtenus sur spécimens papiers par trempage de J0 à J5 à ceux obtenus sur spécimens liquides par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson et l'étude d'agrément selon Passing-Bablok (n : nombre de spécimens ; r : coefficient de corrélation de Pearson ; a et b, paramètres de l'équation de Passing Bablok :  $y = ax + b$  ; [IC à 95%]).

	J0	J1	J2	J3	J4	J5
n	25	25	25	25	25	25
r	0,95 [0,9;0,99]	0,92 [0,83;0,97]	0,9 [0,79;0,96]	0,9 [0,79;0,96]	0,91 [0,8;0,96]	0,92 [0,82;0,96]
a	0,65 [0,45;0,8]	0,63 [0,37;1,00]	0,51 [0,32;1,00]	0,5 [0,36;1,00]	0,5 [0,29;0,86]	0,48 [0,31;1,00]
b	0,05 [0,03;0,08]	0,04 [0,01;0,07]	0,06 [0,01;0,08]	0,06 [0,01;0,07]	0,06 [0,02;0,08]	0,06 [0,01;0,08]

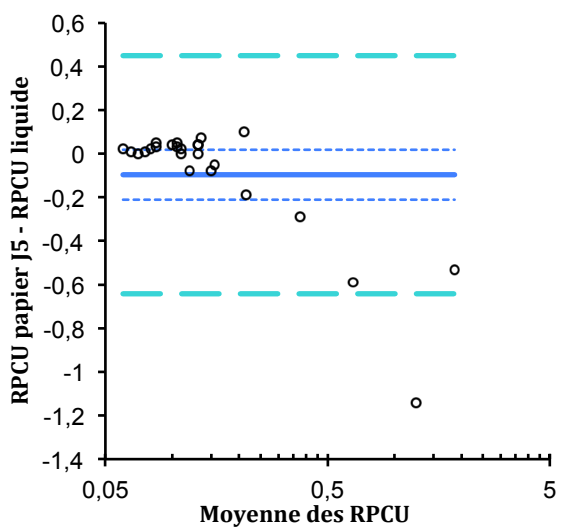
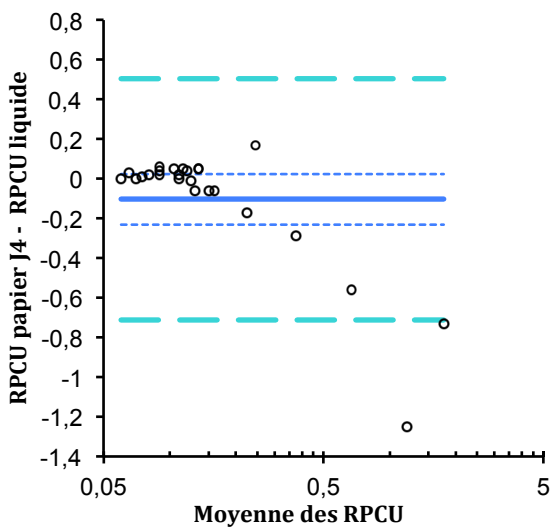
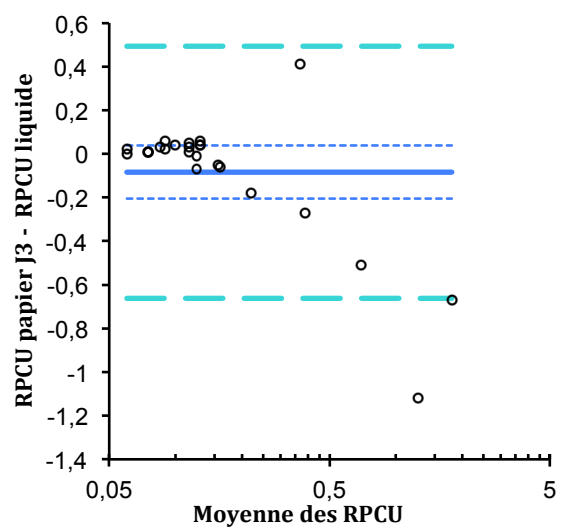
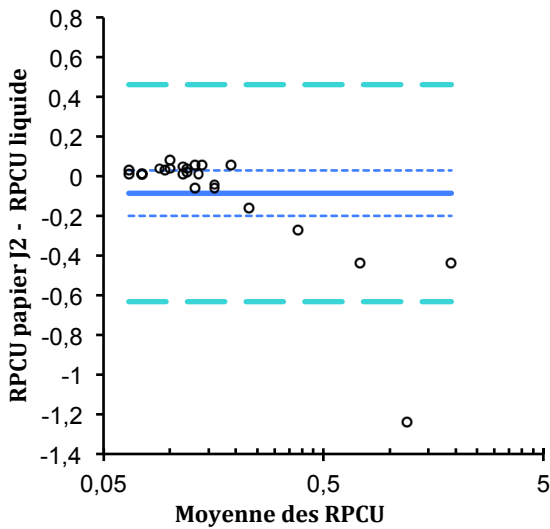
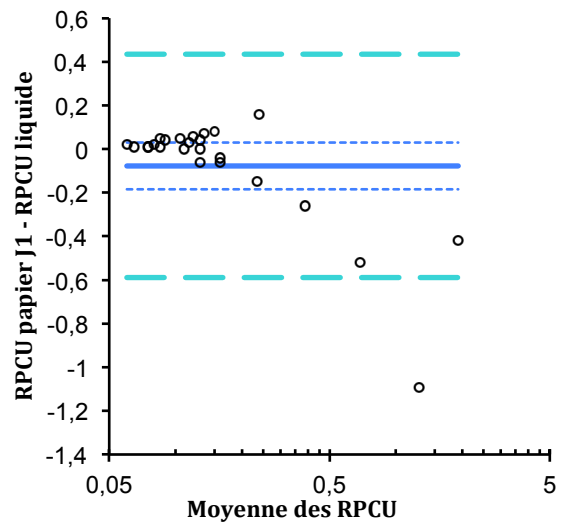
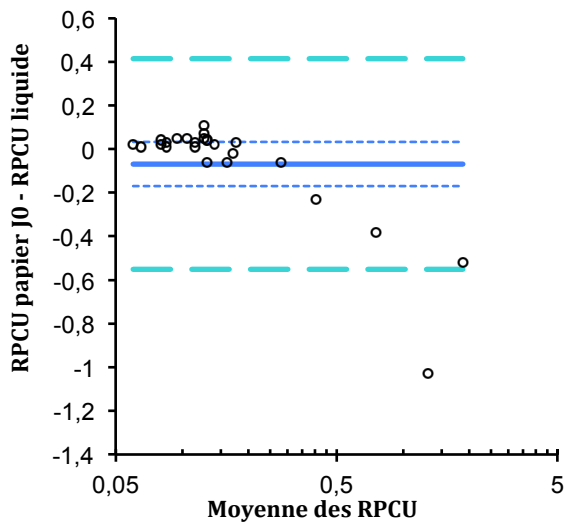
Par ailleurs, l'analyse des différences selon la méthode de Bland-Altman (Figures 25 à 30) montre :

- Une augmentation forte et proportionnelle à partir d'un RPCU de 0,4 à 0,5.
- Des limites d'agrément plus larges avec le trempage qu'avec la méthode plus précise d'élaboration des spécimens papiers (dépôt précis de 200 $\mu$ L d'urines)



Figures 19 à 24 (de gauche à droite et de haut en bas) : **Régression de Passing-Bablok** : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers après trempage, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5).

La ligne pleine épaisse représente la droite de régression, les deux lignes en pointillés l'intervalle de confiance de la régression et la ligne pleine fine la droite d'équation  $y=x$ .



Figures 25 à 30 (de gauche à droite et de haut en bas) : **Graphiques de Bland-Altman** : Comparaison des RPCU mesurés par la méthode de référence à ceux obtenus à partir de spécimens papiers après trempage, à différents moments après séchage (J0, J1, J2, J3, J4 et J5).

La ligne pleine représente la moyenne des différences avec en pointillés courts son intervalle de confiance associé, et les deux lignes en pointillés longs les limites d'agrément supérieure et inférieure.

## 2.4. Erreurs de classification des spécimens sur papier absorbant

Il peut être intéressant de se pencher sur l'erreur de classification des spécimens urinaires sur la base du RPCU obtenu à partir de spécimens papiers en comparaison à la méthode de référence puisque ce qui nous intéresse finalement est l'interprétation la valeur du RPCU permettant de classer ledit spécimen comme non protéinurique, douteux ou protéinurique.

Ainsi, la valeur basale du RPCU (moyenne des duplicata avec la méthode de référence) a permis de définir chaque spécimen comme :

- Non protéinurique ( $\text{RPCU} < 0,2$ ).
- Douteux ( $0,2 \leq \text{RPCU} \leq 0,5$ ).
- Protéinurique ( $\text{RPCU} > 0,5$ ) en distinguant les RPCU strictement compris entre 0,5 et 2,0 et les RPCU supérieurs ou égaux à 2,0.

Les valeurs obtenues sur papiers absorbant de J0 à J5 ont ensuite été considérées. Pour chaque temps d'analyse, le nombre de spécimens papiers dans chaque classe a été comptabilisé, nombre auquel était ensuite soustrait le nombre initial de spécimens comptabilisés dans ladite classe avec la méthode de référence.

Tableau 6: Classification des spécimens à partir des RPCU obtenus par la méthode de référence (Liquide) et sur spécimens papiers de J0 à J5 dans la partie 2 du protocole expérimental (4 classes ayant été définies par 3 valeurs seuil de RPCU : 0,2, 0,5 et 2,0).

	Liquide	J0	J1	J2	J3	J4	J5
RPCU < 0,2	57	-8	-9	-6	-11	-9	-12
$0,2 \leq \text{RPCU} \leq 0,5$	2	+7	+9	+6	+11	+9	+12
$0,5 < \text{RPCU} < 2,0$	2	0	0	0	0	0	0
$\text{RPCU} \geq 2,0$	1	+1	0	0	0	0	0

D'après le tableau 6, on note une fréquence d'erreur de classification des spécimens papiers comprise entre 9,7 (6/62) et 19,4% (12/62). On observe également que les spécimens « mal classés » sont initialement non protéinuriques ( $\text{RPCU} < 0,2$ ). On peut raisonnablement penser qu'il y a une surestimation du RPCU pour les spécimens non protéinuriques (devenant



douteux voire protéinuriques sur spécimens papiers) voire une sous-estimation du RPCU pour les spécimens dont les RPCU sont supérieurs à 0,5 (présence d'un spécimen supplémentaire comptabilisé avec un  $\text{RPCU} \geq 2,0$  à J0).

Tableau 7 : Classification des spécimens à partir du RPCU obtenu par la méthode de référence (Liquide) et sur spécimen papier obtenus par trempage de J0 à J5 dans la partie 3 du protocole expérimental (4 classes ayant été définies par 3 valeurs seuil de RPCU : 0,2, 0,5 et 2,0).

	Liquide	J0	J1	J2	J3	J4	J5
$\text{RPCU} < 0,2$	20	0	0	0	0	0	0
$0,2 \leq \text{RPCU} \leq 0,5$	1	+1	+2	+1	+1	+2	+2
$0,5 < \text{RPCU} < 2,0$	3	0	-1	0	0	-1	-1
$\text{RPCU} \geq 2,0$	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

D'après le tableau 7, on note une fréquence d'erreur de classification avec la méthode sur spécimens papiers obtenus par trempage comprise entre 4 (1/25) et 8% (2/25). Cette fois-ci, les spécimens « mal classés » présentent un RPCU standard  $> 0,5$ .

Cependant, cette approche ne permet cependant pas de distinguer les « échanges » entre les classes et sous-estime donc très probablement le nombre d'erreurs de classification. C'est pourquoi une approche différente d'évaluation de l'erreur de classification des spécimens papiers à partir du RPCU a été menée où chaque spécimen a été considéré individuellement. Les valeurs de RPCU obtenues sur papiers absorbant de J0 à J5 ont alors été considérées. Si la valeur obtenue sur spécimen papier franchissait l'un des seuils (0,2, 0,5 et 2,0) et induisait un changement de classe du spécimen, celui-ci était considéré comme « mal classé », ou « bien classé » dans le cas contraire.

Tableau 8 : Erreurs de classification des spécimens papiers de J0 à J5 par comparaison avec la valeur de RPCU obtenue par la méthode de référence, dans l'étude de comparaison dans une population de chiens sains et protéinuriques (partie 2 du protocole).

	Spécimens « bien classés »				Spécimens « mal classés »			
	RPCU<0,2	0,2≤RPCU≤0,5	0,5<RPCU<2,0	RPCU≥2,0	RPCU<0,2	0,2≤RPCU≤0,5	0,5<RPCU<2,0	RPCU
J0	49	1	0	1	8	1	2	0
J1	48	2	1	1	9	0	1	0
J2	48	1	1	1	9	1	1	0
J3	43	1	1	1	14	1	1	0
J4	46	1	1	1	10	1	1	0
J5	46	2	1	1	11	0	1	0

D'après le tableau 8, 11/62 (17,7%) des spécimens papiers ont été « mal classés » à J0 ainsi que 10/62 (16,1%), 11/62 (17,7%), 16/62 (25,8%), 12/61 (19,7%) et 12/62 (19,4%) à J1, J2, J3, J4 et J5 respectivement. Cela représente une fréquence globale moyenne d'erreur de classification par la méthode sur spécimens papiers de 72/371 (soit 19,4%).

D'après les RPCU obtenus par la méthode de référence sur spécimens liquides, 57 animaux ont été définis comme étant non protéinuriques, 2 douteux, 3 protéinuriques (dont 2 avec un RPCU compris entre 0,5 et 2,0 et 1 avec un RPCU supérieur ou égal à 2,0).

Finalement, la fréquence moyenne globale d'erreur de classification des spécimens papiers au cours du temps est de :

- 61/341 (soit 17,9%) pour les spécimens de  $RPCU < 0,2$ .
- 4/12 (soit 33,3%) pour des spécimens de  $0,2 \leq RPCU \leq 0,5$ .
- 7/12 (soit 58,3%) pour des spécimens de  $0,5 < RPCU < 2,0$ .
- 0% pour des spécimens de  $RPCU \geq 2,0$ .

L'erreur de classification semble majorée pour des spécimens dont le RPCU est élevé. Cependant, ces chiffres sont à manipuler avec précaution, étant donné le peu de recul et le peu de spécimens que nous avons dans les classes hautes (un unique spécimen de  $RPCU \geq 2,0$ , seulement 2 de  $0,5 < RPCU < 2,0$  dont un proche du seuil de 0,5, et 2 de  $0,2 \leq RPCU \leq 0,5$ ).

De plus, ce tableau simplifie les données puisqu'il ne précise pas si l'erreur de classification persiste au cours du temps ou bien s'il s'agit d'une « valeur aberrante ».

Tableau 9 : Erreurs de classification des spécimens papiers obtenus par trempage de J0 à J5 par comparaison avec la valeur de RPCU obtenue par la méthode de référence, dans l'étude de simulation des conditions de prélèvement d'un propriétaire à son domicile (partie 3 du protocole).

	Spécimens « bien classés »				Spécimens « mal classés »			
	RPCU<0,2	0,2≤RPCU≤0,5	0,5<RPCU<2,0	RPCU≥2,0	RPCU<0,2	0,2≤RPCU≤0,5	0,5<RPCU<2,0	RPCU
J0	20	1	2	0	0	0	1	1
J1	19	0	1	0	1	1	2	1
J2	19	0	2	0	1	1	1	1
J3	19	0	1	0	1	1	2	1
J4	19	0	1	0	1	1	2	1
J5	19	0	1	0	1	1	2	1

D'après le tableau 9, 2/25 (8%) des spécimens papiers ont été « mal classés » à J0, ainsi que 5/25 (20%) et 4/25 (16%) à J1 et J2 respectivement, et enfin 5/25 (20%) des spécimens papiers à J3, J4 et J5. Cela représente une fréquence moyenne d'erreur de classification de 17,3% sur spécimens papiers entre 0 et 5 jours post-séchage.

D'après les RPCU obtenus par la méthode de référence, 20 spécimens ont été définis comme étant non protéinuriques, 1 douteux et 4 protéinuriques (dont 3 avec un RPCU compris entre 0,5 et 2,0 et 1 avec un RPCU supérieur ou égal à 2,0).

Finalement, la fréquence moyenne globale d'erreur de classification des spécimens papiers au cours du temps est de :

- 5/120 (4,2%) pour les spécimens de  $RPCU < 0,2$ .
- 5/6 (83,3%) pour des spécimens de  $0,2 \leq RPCU \leq 0,5$ .
- 10/18 (55,6%) pour des spécimens de  $0,5 < RPCU < 2,0$ .
- 6/6 (100%) pour des spécimens de  $RPCU \geq 2,0$ .

Comme précédemment, il faut considérer ces chiffres avec précautions étant donné le peu de spécimens à disposition, sauf peut-être pour les spécimens non protéinuriques. De plus, l'erreur de classification de 100% constatée pour l'unique spécimen de  $RPCU \geq 2,0$  n'a pas de conséquence clinique grave puisque le spécimen en question présente des valeurs de RPCU sur spécimen papier toujours très largement supérieures à 1,0 (protéinurie indiscutable).

Finalement, les résultats concernant la fréquence d'erreur de classification des spécimens à partir des RPCU obtenus sur spécimens papiers comparés aux RPCU obtenus par la méthode standard sont satisfaisants, avec toutefois la réserve du peu de recul et du peu de spécimens que nous avons. Il faut souligner qu'une part potentielle d'erreur de classification des spécimens peut être liée à l'imprécision de l'analyseur. Les CV calculés à partir des contrôles de qualité quotidiens pour la créatininurie, la protéinurie et le RPCU étaient de 10,2%, 11,2% et 7,8% respectivement.

Pour affiner l'approche, il pourrait être intéressant d'estimer la fréquence d'erreur de classification avec la méthode sur spécimens papiers pour des urines dont la valeur du RPCU obtenue par la méthode de référence est proche des seuils décisionnels de 0,2 et 0,5. Il faudrait néanmoins tenir compte de la variabilité analytique du RPCU pour déterminer les valeurs seuils à partir desquelles un spécimen serait considéré comme « mal classé ». Finalement, l'interprétation de ces chiffres serait délicate et son intérêt limité. D'autant plus que l'interprétation même du RPCU autour des seuils de décision est sujette à controverse et qu'il est conseillé de réaliser un suivi de l'animal dans ce cas pour confirmer ou infirmer la suspicion de protéinurie.

## 2.5. Répétabilité et reproductibilité

Le contrôle de répétabilité effectué sur les spécimens canins a montré qu'il n'y a eu aucun effet significatif du papier utilisé ou du numéro de l'essai à chaque échéance (ANOVA,  $p > 0,05$ ), excepté pour le numéro de l'essai à J4 ( $p = 0,019$  avec des résultats légèrement inférieurs (0,08 en moyenne) dans la 3<sup>ème</sup> que dans la 2<sup>ème</sup> série) (Tableau 12).

Les CV médians étaient voisins de 10% mais ont varié très notablement en fonction des spécimens, de 0,0% à 85% (Tableau 12).

Tableau 10 : Imprécision de la mesure RPCU de J0 à J5 via le calcul du coefficient de variation (CV) moyen, médian, minimum (mini) et maximum (maxi).

	J0	J1	J2	J3	J4	J5
CV moyen	14.1	13.8	10.6	14.6	16.2	10.4
CV mini	2.2	2.6	2.9	0.0	0.0	0.0
CV maxi	64.2	85.1	44.3	61.4	61.1	38.3
CV médian	10.5	10.1	7.0	7.3	7.4	8.1

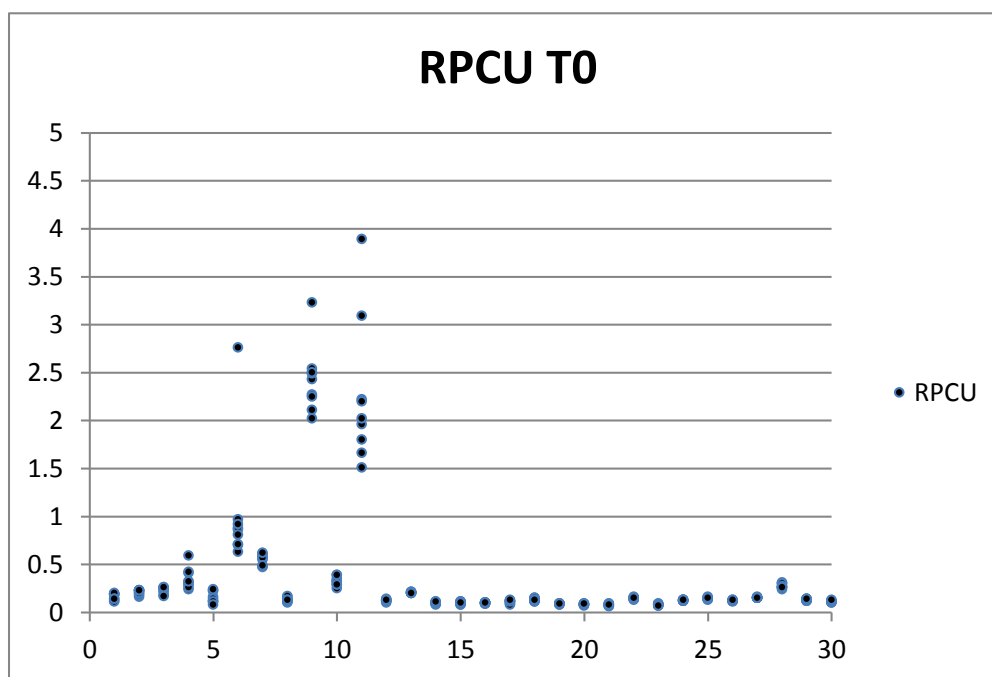


Figure 31 : Scatter plot représentant la distribution des n=9 valeurs de RPCU obtenues pour chacun des 30 spécimens à T0.

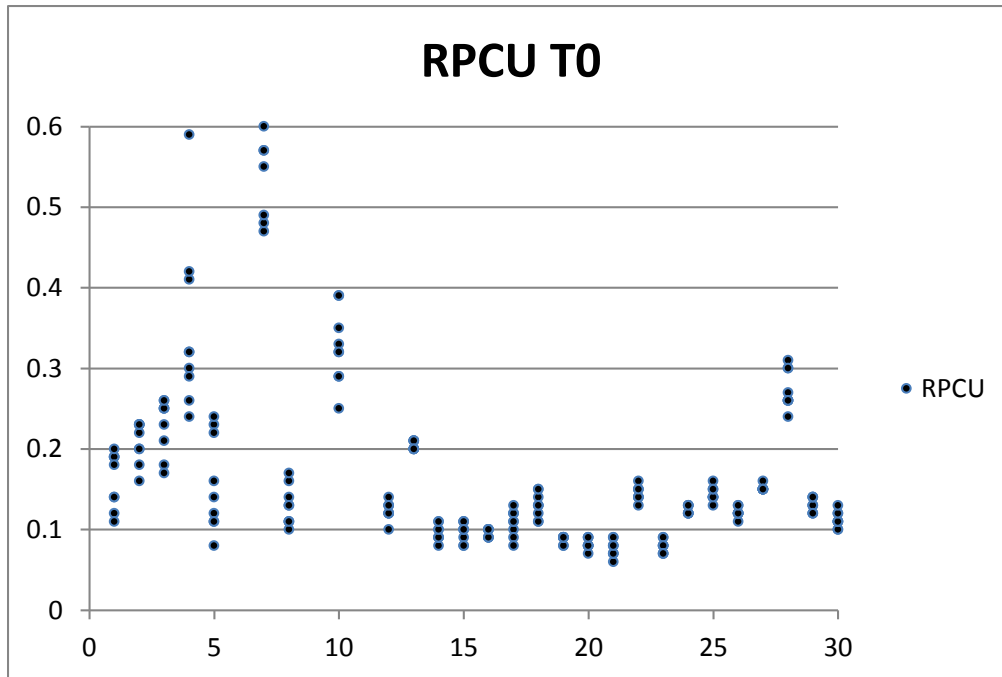


Figure 32 : Scatter plot représentant la distribution des valeurs de RPCU (n=9) obtenues pour chacun des 30 spécimens à T0 avec une restriction d'échelle (permettant de mieux se représenter la variabilité intra-individuelle).

L'examen détaillé des 9 résultats obtenus chez chaque sujet chaque jour montre que la variabilité est telle que les séries de résultats de certains animaux se situent de part et d'autres des seuils décisionnels de 0,2 et 0,5, voire du seuil de classification clinique de 2,0 (exemple à J0, Figures 31 et 32).

Le contrôle de reproductibilité effectué de J0 à J5 sur les 3 spécimens papier traités 3 fois (n=9) a montré un effet significatif du jour sur les valeurs observées (ANOVA,  $P = 0,000$ ) mais peu de différences entre les paires d'observations, n'entraînant les franchissements des seuils de décision de 0,2, 0,5 et 2,0 que dans peu de cas (Figure 33). Le CV médian calculé sur les moyennes quotidiennes (n=9) de chaque spécimen était de 12,1%, avec un intervalle minimum-maximum de 4,7 à 31,3%.

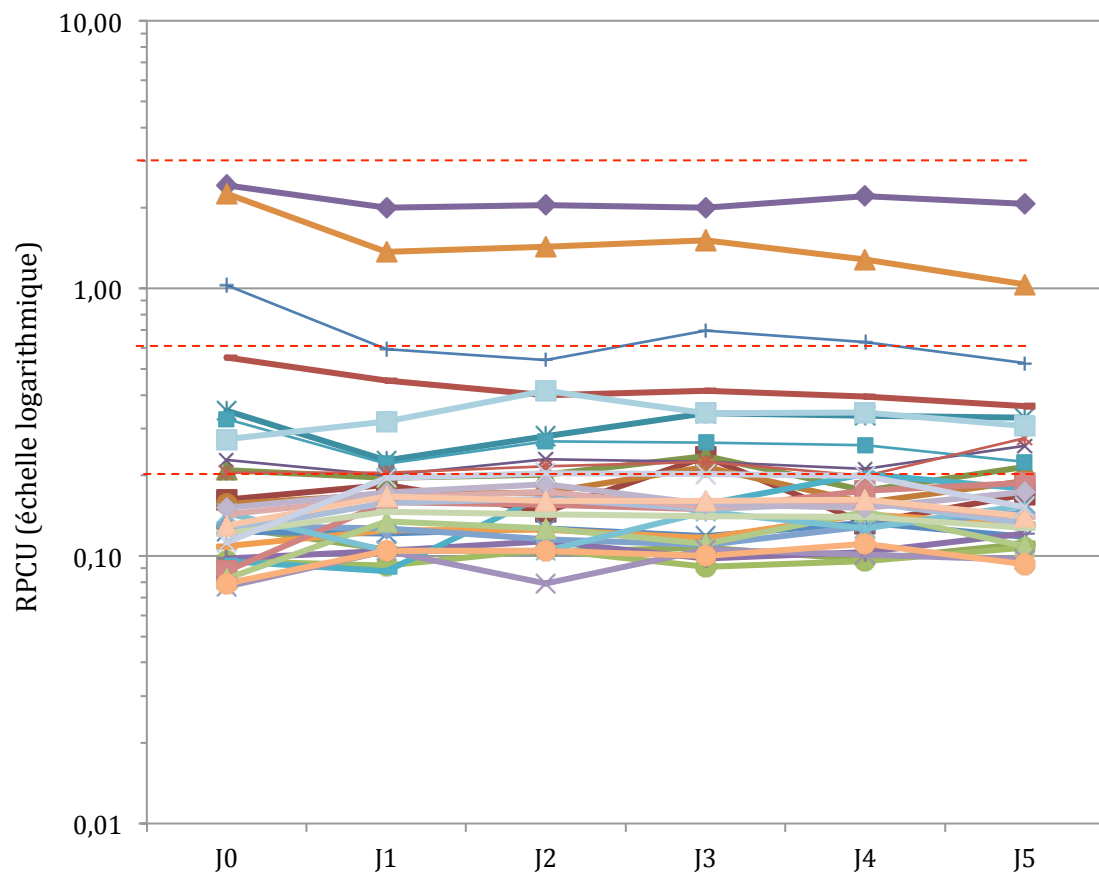


Figure 33 : Évolution du RPCU moyen (n=9) des 30 spécimens traités de J0 à J5. Les lignes rouges pointillées représentent les seuils décisionnels de 0,2, 0,5 et 2,0.

### 3. Discussion

#### 3.1. Validité du protocole expérimental

Le but de cette expérimentation était de tester si un contrôle de la protéinurie pouvait être effectué à distance d'un laboratoire unique sur des spécimens collectés par les propriétaires en personne.

Cela a justifié les étapes successives du protocole qui a montré :

1/ Que la mesure du RPCU était possible sur des spécimens d'urine collectés sur des papiers absorbants conservés plusieurs jours.

2/ Que cette mesure du RPCU donnait de moins bons résultats si les spécimens étaient obtenus par trempage d'un papier et non par dépôt d'un volume contrôlé d'urine.

Le dernier point nécessite d'être approfondi dans deux directions. Il peut être envisagé de donner au propriétaire dont le chien est suivi une série de papiers et un compte-gouttes, en lui demandant de déposer 4 gouttes, soit environ 200  $\mu$ L d'urine sur les papiers. Cela impose cependant que le propriétaire recueille l'urine lors de la miction dans un récipient. Une autre piste est celle de collecter l'urine directement à partir d'un spécimen émis sur le sol avec les éventuels effets de la contamination et encore d'un volume incertain, surtout sur un sol absorbant.

Un autre aspect n'a pas été complètement testé : la stabilité des spécimens lors d'envoi postal. Il paraît peu probable que l'expédition de papiers séchés dans une enveloppe modifie la composition des spécimens, mais les délais pourraient éventuellement excéder ceux pour lesquels nous avons testé la stabilité du RPCU.

Enfin, l'analyse de spécimens collectés sur papier ne permet pas de s'assurer des caractéristiques des urines collectées, notamment de possibles altérations cytologiques, une leucocyturie par exemple. Une analyse simultanée avec une bandelette urinaire détectant la présence de leucocytes aurait peu de valeur vu le manque de sensibilité et de spécificité de cette analyse dans les urines canines.

#### 3.2. Imprécision de la méthode d'analyse sur papier absorbant

Les résultats ont montré que dans la majorité des cas, toutes échéances de stockage comprises, les spécimens étaient classés de manière identique par la méthode sur papier et la méthode de



référence en fonction des seuils de 0,2, 0,5 et 2.0. La réelle question pratique se posant est celle de la classification des spécimens au voisinage de ces mêmes seuils.

Une partie de l'incertitude tient à la mesure habituelle du RPCU. Dans le cadre de cette expérimentation, les CV de l'imprécision calculés à partir des contrôles de qualité quotidiens pour la créatininurie, la protéinurie et le RPCU étaient de 10,2%, 11,2% et 7,8% respectivement. Dans une étude précédente, la fréquence des erreurs liées à l'imprécision avec la technique habituelle de mesure du RPCU autour des seuils décisionnels de 0,2 et 0,5 a été évaluée à 20% et 43% respectivement [71]. Cela est d'ailleurs cohérent avec les stratégies qui ont été proposées :

- Pour le **dépistage des protéinuries**, où la recommandation est de l'observer dans au moins 3 spécimens collectés sur 2 semaines minimum [31].

Plusieurs recommandations et stratégies différentes ont également été évoquées afin de s'affranchir de la variabilité analytique du RPCU. En médecine humaine, on considère qu'il faut 5 spécimens pour disposer d'une estimation fiable du RPCU, sans préciser toutefois si ce nombre diffère selon la valeur de la densité urinaire (la variabilité analytique du RPCU étant majorée pour des spécimens fortement dilués) [71]. Pour des spécimens canins dont le RPCU basal est inférieur à 4, l'estimation donnée sur une analyse unique d'un spécimen à un instant t est très fiable [55]. Un suivi est néanmoins fortement conseillé pour un RPCU proche des seuils décisionnels (0,2 et 0,5).

- La **surveillance du RPCU** chez le chien : certains ont suggéré d'utiliser des pools d'urines de 3 jours pour limiter la variabilité intra-individuelle [55,59]. D'autres auteurs ont montré qu'il fallait 4 à 5 mesures pour obtenir une valeur fiable de spécimens dont le RPCU est supérieur à 8 [55,58]. Pour des valeurs de RPCU comprises entre 4 et 8, répéter la mesure sur 2 à 3 spécimens distincts (spécimens analysés séparément ou poolés et prélevés sur une période de 3 jours minimum) permettrait d'améliorer largement la précision de l'estimation [55]. Néanmoins, l'intérêt de suivre la valeur du RPCU chez un animal présentant de telles valeurs reste limité (éventuellement évaluer l'efficacité d'un traitement).

Par conséquent, il semble que l'imprécision de la méthode sur papier absorbant pourrait également être palliée par la réalisation de plusieurs prélèvements le même jour ou plusieurs jours consécutifs, que les papiers collectés pourraient être poolés etc... Mais cela nécessiterait des études complémentaires.

### 3.3. Méthodes alternatives à la mesure standard du RPCU

Le suivi du RPCU peut actuellement être effectué soit dans un laboratoire d'analyses de biologie médicale (LABM) vétérinaires ou humaines, soit dans le laboratoire d'une clinique vétérinaire. Dans ce dernier cas, quelques cliniques disposent d'automates permettant une détermination habituelle de ce rapport à l'aide de réactifs liquides ; un nombre plus important de cliniques possède un automate utilisant des réactifs à usage unique sous forme de supports multi-couches pour le dosage de la créatinine et des protéines urinaires ; enfin, quelques cliniques peuvent avoir de petits réflectomètres portables, lecteurs de bandelettes réactives, permettant une évaluation semi-quantitative du RPCU. À notre connaissance, seuls ces derniers ont été validés avec des urines canines [128–130].

Defontis et al. ont étudié chez le chien la bandelette Aution 10PA® (Aution Sticks 10PA, ARKRAY, Kyoto, Japon) [128], qui a déjà montré des résultats satisfaisants et spécifiques pour la détection d'une protéinurie chez l'homme [131,132]. Welles et al. ont aussi étudié chez le chien l'intérêt d'autres bandelettes urinaires (bandelettes MultistixPRO®, Bayer Corporation, Elkhart, IN, USA) [129].

La lecture de ces bandelettes peut être visuelle ou effectuée à l'aide d'automates spécifiques (Aution Eleven Reflectometer AE-4020 [128] et Clinitek50® Analyzer [129]). Des études en médecine humaine ont préalablement établi la supériorité de la lecture automatisée à la lecture visuelle [133], confirmée chez le chien [128]. L'intérêt d'utiliser un analyseur est de standardiser les résultats (d'un observateur à l'autre notamment) et d'éviter aussi les erreurs de transcription. Cependant, cette supériorité n'est pas absolue. En effet, le calcul du RPCU à partir d'une lecture visuelle des plages créatinine et protéines des bandelettes MultistixPRO® présentait une sensibilité de 61,3% et une spécificité de 97,1% à détecter des spécimens protéinuriques (RPCU > 0,5) contre une sensibilité et spécificité de la lecture automatisée de 90,3% et 66,7% respectivement dans la même étude [129].

D'après l'étude de Defontis et al., il existe une bonne corrélation entre les résultats de la bandelette Aution 10PA® pour la protéinurie et la créatininurie avec les méthodes standards

d'analyse quantitative (coefficients de corrélation de Spearman  $r_s = 0,88$  et  $r_s = 0,86$  respectivement) et une corrélation moyenne pour le RPCU ( $r_s = 0,75$ ). Celle-ci a aussi présenté une très bonne spécificité pour le RPCU chez le chien à une valeur seuil de 0,4 (spécificité de 91,2% et IC 95% = [81,8-96,7] ; sensibilité de 84,8% et IC 95% = [68,1-94,9]) [128]. Cela en fait *a priori* un outil très intéressant et hautement spécifique pour exclure une protéinurie à partir du RPCU.

Dans tous les cas, les mesures du RPCU dans les cliniques vétérinaires ou des LABM humains permettent une bonne comparaison entre analyses consécutives chez le même sujet si les conditions d'étalonnage et de contrôle de qualité sont respectées, ce qui est garanti dans les LABM humains. Cependant, la majorité des cliniques vétérinaires ne disposent pas d'analyseurs permettant la mesure du RPCU et le recours à un LABM humain n'est pas toujours facile.

L'avantage majeur d'une collecte des urines par les propriétaires eux-mêmes et de l'envoi de papiers à un laboratoire est celui de la praticité : possibilité de multiplier les spécimens, de les pooler, de les expédier par la poste. Cela constitue la base de possibilités de surveillance appréciables surtout dans les populations canines à risques chez les éleveurs [134], en gardant le contact avec le vétérinaire mais sans le surcharger avec des examens répétitifs.

Au plan financier, le coût d'un tel examen est celui d'une analyse habituelle, même si le délai de préparation du spécimen est plus long : « hachage » du papier, mise en solution et centrifugation sont des étapes préalables prenant quelques minutes. S'y ajoutent le coût négligeable du papier absorbant et celui limité de l'envoi postal.

Cette méthode n'offre pas un intérêt majeur pour le dépistage de la protéinurie qui peut être faite en routine avec les bandelettes habituelles, y compris directement dans les élevages par les propriétaires d'animaux à risques de développer des néphropathies congénitales. Mais la mesure du RPCU sur spécimens urinaires collectés sur papier absorbant et l'analyse dans un même LABM vétérinaire (ou humain) offre une perspective intéressante en permettant aux propriétaires, sur les conseils de leur vétérinaire, de multiplier les collectes et de préparer eux-mêmes les spécimens, tout en limitant le coût global de la surveillance du RPCU chez les sujets justifiant ces contrôles.

## CONCLUSION

La première évaluation de cette méthode de mesure du RPCU sur spécimens papiers a permis d'en démontrer la faisabilité et d'en valider les principes et grandes lignes techniques. Cette méthode faciliterait et simplifierait le suivi du RPCU d'animaux protéinuriques ou à risques de développer une néphropathie, tout en limitant le coût global de ce suivi. Les résultats obtenus dans des conditions standardisées sont sensiblement meilleurs que par trempage.

On pourrait aussi envisager une comparaison de la méthode introduite ici avec les méthodes semi-quantitatives de mesure du RPCU via des bandelettes urinaires développées initialement en médecine humaine, bien que leurs intérêts soient sensiblement différents. En effet, la méthode développée ici présente l'intérêt de s'affranchir de la consultation systématique chez le vétérinaire et de permettre un suivi quantitatif et simplifié de la protéinurie, alors que les bandelettes urinaires permettent un diagnostic et une caractérisation de la protéinurie au chevet du malade dans le cadre d'un dépistage. De plus, la lecture de ces bandelettes ne peut *a priori* se faire qu'en structure vétérinaire (la lecture automatisée étant fortement conseillée).

Cette méthode de mesure du RPCU sur spécimens urinaires collectés sur papier absorbant présente donc des perspectives intéressantes, surtout dans le cadre d'un suivi vétérinaire d'animaux suspects ou atteints de maladies rénales, mais des études complémentaires sont encore nécessaires afin de la rendre aisée et reproductible pour un propriétaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] FINCO DR. Urinary protein loss. *Canine Feline Nephrol. Urol.*, 1995, p. 211–5.
- [2] WILSON DM, ANDERSON RL. Protein-osmolality ratio for the quantitative assessment of proteinuria from a random urinalysis sample. *Am J Clin Pathol* 1993;100:419–24.
- [3] DIBARTOLA SP, CHEW DJ, JACOBS G. Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1980;16:537–46.
- [4] WATSON ADJ, LEFEBVRE HP, CONCORDET D, LAROUTE V, FERRÉ J-P, BRAUN J-P, et al. Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs : comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *J Vet Intern Med* 2002;16:22–33.
- [5] BARSANTI JA, FINCO DR. Protein concentration in urine of normal dogs. *Am J Vet Res* 1979;1583–8.
- [6] McCAW DL, KNAPP DW, HEWETT JE. Effect of collection time and exercise restriction on the prediction of urine protein excretion using urine protein/creatinine ratio in dogs. *Am J Vet Res* 1985;46:1665–9.
- [7] GRAUER GF. Clinicopathologic evaluation of early renal disease in dogs. *Compend Contin Educ Pr Vet* 1985;7:32–8.
- [8] LAROUTE V, CHETBOUL V, ROCHE L. Quantitative evaluation of renal function in healthy Beagle puppies and mature dogs. *Res Vet Sci* 2005;79:161–7.
- [9] LANE IF, SHAW DH, BURTON SA. Quantitative urinalysis in healthy Beagle puppies from 9 to 27 weeks of age. *Am J Vet Res* n.d.;61:577–81.
- [10] BIEWENGA WJ, GRUYS E, HENDRIKS HJ. Urinary protein loss in the dog : nephrological study of 29 dogs without signs of renal disease. *Res Vet Sci* 1982:366–74.
- [11] WHITE J, OLIVIER N, REIMANN, JOHNSON C. Use of protein-to-creatinine ratio in a single urine specimen for quantitative estimation of canine proteinuria. *J Am Vet Med Assoc* 1984;185:882–5.
- [12] LULICH JP, OSBORNE CA. Interpretation of urine protein-to-creatinine ratios in dogs with glomerular and non glomerular disorders. *Compend Contin Educ Pr Vet* 1990;12:59–73.
- [13] EPSTEIN JB, ZAMBRASKI JE. Proteinuria in the exercising dog. *Med Ans Sci Sports* 1979;11:348–50.
- [14] PRICE CP, NEWALL RG, BOYD JC. Use of protein : creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. *Clin Chem* 2005;51:1577–86.
- [15] BOVEE KC. Urine osmolarity as a definitive indicator of renal concentrating capacity. *J Am Vet Med Assoc* 1969;155:30–5.
- [16] OSBORNE CA, STEVENS JB, LULICH JP. A clinician's analysis of urinalysis. *Canine Feline Nephrol. Urol.*, 1995, p. 136–205.
- [17] HENDRIKS HJ, DE BRUIJNE JJ, VAN DEN BROM WE. The clinical

refractometer : a useful tool for the determination of specific gravity and osmolality in canine urine. *Tijdschr Diergeneeskd* 1978;103:1065–8.

[18] DOSSIN O, GERMAIN C, BRAUN JP. Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog. *J Vet Med Ser* 2003;50:322–5.

[19] GRAUER GF, THOMAS CB, EICKER SW. Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample. *Am J Vet Res* 1985;46:2116–9.

[20] HARRIS RC, LOWE JA, WARNES K. The concentration of creatinine in meat, offal and commercial dog food. *Res Vet Sci* 1997;62:58–62.

[21] O'CONNELL JMB, ROMEO JA, MUDGE GH. Renal tubular secretion of creatinine in the dog. *Am J Physiol* 1962;203:985–90.

[22] SWANSON R, HAKIM AA. Stop-flow analysis of creatinine excretion in the dog. *Am J Physiol* 1962;203:980–4.

[23] WATSON AD, LEFEBVRE HP, CONCORDET D. Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs : comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *J Vet Intern Med* 2002;16:22–33.

[24] UECHI M, TERUI H, NAKAYAMA T. Circadian variation of urinary enzymes in the dog. *J Vet Med Sci* 1994;56:949–854.

[25] BELSHAW BE. The differential diagnosis of polyuria/polydipsia in dogs. *Vet Q* 1995;17:19–21.

[26] BRAUN JP, LEFEBVRE HP, WATSON AD. Creatinine in the dog : a review. *Vet Clin Pathol* 2003;162–79.

[27] TRUMEL C, DIQUELOU A, LEFEBVRE H, BRAUN JP. Inaccuracy of routine creatinine measurement in canine urine. *Vet Clin Pathol* 2004;33:128–32.

[28] VESTERGAARD P, LEVERETT R. Constancy of urinary creatinine excretion. *J Lab Clin Med* 1958;51:211–8.

[29] UECHI M, UECHI H, NAKAYAMA T. The variation of excretory urinary glycyl-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in dogs. *Res Vet Sci* 1997;63:97–9.

[30] CENTER SA, WILKINSON E, SMITH CA, ERB H, LEWIS RM. 24-Hour urine protein/creatinine ratio in dogs with protein-losing nephropathies. *J Am Vet Med Assoc* 1985;187:820–4.

[31] LEES GE, BROWN SA, ELLIOTT J, GRAUER GF, VADEN SL. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J Vet Intern Med* 2005;19:377–85.

[32] DOMACHEVSKY L, GRUPPER M, SHOCHAT T. Proteinuria on dipstick urine analysis after sexual intercourse. *BJU Int* 2006;97:146–8.

[33] BLUMSOHN A, PRICE A, MORRIS BW. The effect of semen contamination on the concentration of low molecular weight proteins, albumin and total protein in male urine. *Ann Clin Biochem* 1991;28:187–8.

[34] PROBER LG, JOHNSON CA, OLIVIER NB, THOMAS JS. Effect of semen in urine specimens on urine protein concentration determined by means of dipstick analysis. *Am J Vet Res* 2010;71:288–92.

- [35] DOOLEY MP, PINEDA MH, HOOPER JG, HSU WH. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of dogs during ejaculation or after sedation with xylazine. *Am J Vet Res* 1990;51:1574–9.
- [36] BEAUFAYS F, ONCLIN K, VERSTEGEN J. Retrograde ejaculation occurs in the dog, but can be prevented by pre-treatment with phenylpropanolamine : a urodynamic study. *Theriogenology* 2008;70:1057–64.
- [37] BALL BA, GRAVANCE CG, MEDINA V, BAUMBER J, LIU IK. Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res* 2000;61:1026–30.
- [38] BAUMBER J, BALL BA. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. *Am J Vet Res* 2005;66:1415–9.
- [39] TRIFUNAC N, BERNSTEIN GS. Inhibition of the oxidative metabolism of human spermatozoa by a heat-labile factor in seminal plasma. *Fertil Steril* 1976;27:1295–300.
- [40] SCHELLENBERG S, METTLER M, GENTILINI F, PORTMANN R, GLAUS TM, REUSCH CE. The Effects of Hydrocortisone on Systemic Arterial Blood Pressure and Urinary Protein Excretion in Dogs. *J Vet Intern Med* 2008;22:273–81.
- [41] HENEGAR JR, BIGLER SA, HENEGAR LK, TYAGI SC, HALL JE. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1211–7.
- [42] TVARIJONAVICLUTE A, CERON JJ, HOLDEN SL, BIOURGE V, MORRIS PJ, GERMAN AJ. Effect of Weight Loss in Obese Dogs on Indicators of Renal Function or Disease. *J Vet Intern Med* 2013;27:31–8.
- [43] TEFFT KM, SHAW DH, IHLE SL, BURTON SA, PACK L. Association between excess body weight and urine protein concentration in healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 2014;n/a–n/a.
- [44] O’CONNOR WJ, SUMMERILL RA. The excretion of urea by dogs following a meat meal. *J Physiol* 1976;256:93–102.
- [45] WATSON AD, CHURCH DB, FAIBURN AJ. Postprandial changes in plasma urea and creatinine concentrations in dogs. *Am J Vet Res* 1981;42:1878–80.
- [46] WATSON AD, CHURCH DB. Postprandial increase in plasma creatinine concentration in dogs fed cooked meat. *Aust Vet J* 1980;56:463.
- [47] XIN G, WANG M, JIAO L. Protein-to-creatinine ratio in spot urine samples as a predictor of quantitation of proteinuria. *Clin Chem Acta* 2004;350:35–9.
- [48] NEWMAN DJ, PUGIA MJ, LOTT JA. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. *Clin Chim Acta* 2000;294:139–55.
- [49] CASTENFORS J. Renal function during exercise. With special reference to exercise proteinuria and the release of renin. *Acta Physiol Scand Suppl* 1967:1–44.
- [50] KING SE, BALDWIN SD. Production of renal ischemia and proteinuria in men by the adrenal medullary hormones. *Am J Med* 1956;20:217–24.
- [51] POORTMANS J, JEANLOZ RW. Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in human urine collected before and after exercise. *J Clin Invest* 1968;47:386.
- [52] DELGADO R, SANDERS TM, BLOOR CM. Renal blood flow distribution during

steady-state exercise and exhaustion in conscious dogs. *J Appl Phys* 1975;39:475–8.

[53] GARY AT, COHN LA, KERL ME, JENSEN WA. The effects of exercise on urinary albumin excretion in dogs. *J Vet Intern Med* 2004;18:52–5.

[54] YOSHIMOTO M, TSUKAHARA H, SAITO M, HAYASHI S, HARUKI S, FUJISAWA S, et al. Evaluation of variability of proteinuria indices. *Pediatr Nephrol* 1990;4:136–9.

[55] NABITY MB, BOGGESS MM, KASHTAN CE, LEES GE. Day-to-Day Variation of the Urine Protein: Creatinine Ratio in Female Dogs with Stable Glomerular Proteinuria Caused by X-Linked Hereditary Nephropathy. *J Vet Intern Med* 2007;21:425–30.

[56] YOUNG DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Assoc Clin Chem* 1990;Incorporated.

[57] GRAUER GF, GRECO DS, GETZY DM, COWGILL LD, VADEN SL, CHEW DJ, et al. Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *J Vet Intern Med* 2000;14:526–33.

[58] GIBB DM, SHAH V, PREECE M, BARRATT TM. Variability of urine albumin excretion in normal and diabetic children. *Pediatr Nephrol* 1989;3:414–9.

[59] LE VINE DN, ZHANG D, HARRIS T, VADEN SL. The use of pooled vs serial urine samples to measure urine protein:creatinine ratios. *Vet Clin Pathol* 2010;39:53–6.

[60] POLZIN DJ, BARTGES J. Chronic Kidney Disease. *Nephrol. Urol. Small Anim.*, 2011.

[61] BERTAGNA X, GUIGNAT L, GROUSSIN L, BERTHERAT J. Cushing's disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:607–23.

[62] SMETS P, MEYER E, MADDENS B, DAMINET S. Cushing's syndrome, glucocorticoids and the kidney. *Gen Comp Endocrinol* 2010;169:1–10.

[63] ORTEGA TM, FELDMAN EC, NELSON RW, WILLITS N, COWGILL LD. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1996;209:1724–9.

[64] WATERS CB, ADAMS LG, SCOTT-MONCRIEFF JC, DE NICOLAS DB, SNYDER PW, WHITE MR, et al. Effects of Glucocorticoid Therapy on Urine Protein-to-Creatinine Ratios and Renal Morphology in Dogs. *J Vet Intern Med* 1997;11:172–7.

[65] KUBOTA E, HAYASHI K, MATSUDA H, HONDA M, TOKUYAMA H, OKUBO K, et al. Role of intrarenal angiotensin II in glucocorticoid-induced renal vasodilation. *Clin Exp Nephrol* 2001;5:186–92.

[66] BAGLEY RS, CENTER SA, LEWIS RM. The effect of experimental cystitis and iatrogenic blood contamination on the urine protein/creatinine ratio in the dog. *J Vet Intern Med* 1991;5:66–70.

[67] VADEN SL, PRESSLER BM, LAPPIN MR, JENSEN WA. Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. *Vet Clin Pathol* 2004;33:14–9.

[68] FETTMAN MJ. Comparison of urinary protein concentration and protein/creatinine ratio vs routine microscopy in urinalysis of dogs : 500 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1989;195:972–6.

[69] MAUREY C. Sémiologie biologique urinaire. *EMC - Vétérinaire* 2005;2:156–68.



- [70] BEATRICE L, NIZI F, CALLEGARI D, PALTRINIERI S, ZINI E, D'IPPOLITO P, et al. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010;236:1221–4.
- [71] ROSSI G, GIORI L, CAMPAGNOLA S, ZATELLI A, ZINI E, PALTRINIERI S. Evaluation of factors that affect analytic variability of urine protein-to-creatinine ratio determination in dogs. *Am J Vet Res* 2012;73:779–88.
- [72] LE BRICON T, ERLICH D, DUSSAUCY M, GARNIER JP, BOUSQUET B. Dosage des protéines urinaires totales. Etude comparative des techniques automatisées à l'acide trichloracétique et au rouge de pyrogallol pour les échantillons contenant des chaînes légères monoclonales. *Ann Biol Clin (Paris)* 1998;56:719–23.
- [73] WATANEBE N, KAMEI S, OHKUBO A, YAMANAKA M, OHSAWA S, MAKINO K, et al. Urinary proteins as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem* 1986;32:1551–4.
- [74] ORSONNEAU JL, DOUET P, MASSOUBRE C, LUSTENBERGER P, BERNARD S. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. *Clin Chem* 1989;35:2233–6.
- [75] BEHR S, TRUMEL C, PALANCHE F, BRAUN JP. Assessment of a pyrogallol red technique for total protein measurement in the cerebrospinal fluid of dogs. *J Small Anim Pract* 2003;44:530–3.
- [76] MARSHALL T, WILLIAMS KM. Protein determination in cerebrospinal fluid by protein dye-binding assay. *Br J Biomed Sci* 2000;57:281–6.
- [77] GYURE WL. Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin Chem* 1977;23:876–9.
- [78] LEFEVRE G, BLOCH S, LE BRICON T, BILLIER S, ARIEN S, CAPEAU J. Influence of protein composition on total urinary protein determined by pyrocatechol-violet (UPRO Vitros) and pyrogallol red dye binding methods. *J Clin Lab Anal* 2001;15:40–2.
- [79] FIORINA JC, AIMONE-GASTIN I, PITIOT V, GUEANT JL. Dosage des protéines urinaires totales par une technique automatisée au rouge de pyrogallol. *Ann Biol Clin (Paris)* 2001;59:187–92.
- [80] OSICKA TM, PANAGIOTOPOULOS S, JERUMS G, COMPER WD. Fractional clearance of albumine is influenced by its degradation during renal passage. *Clin Sci* 1997;93:557–64.
- [81] OSICKA TM, HOULIHAN CA, CHAN JG, JERUMS G, COMPER WD. Albuminuria in patients with type I diabetes is directly linked to changes in the lysosome-mediated degradation of albumin during renal passage. *Diabetes* 2000;49:1579–84.
- [82] BURNE MJ, PANAGIOTOPOULOS S, JERUMS G, COMPER WD. Alterations in renal degradation of albumin in early experimental diabetes in the rat: a new factor in the mechanism of albuminuria. *Clin Sci* 1998;95:67–72.
- [83] EPEL GA, NAGY S, JENKINS MA, TUDBALL RN, DASKALAKIS M, BALAZS NDH, et al. Variability of standard clinical protein assays in the analysis of a model urine solution of fragmented albumin. *Clin Biochem* 2000;33:487–94.
- [84] MARSHALL T, WILLIAMS KM. Drug interference in the Bradford and 2,2'-bicinchinic acid protein assays. *Ann Clin Biochem* 1991;198:352–4.
- [85] FUJITA Y, MORI I, KITANO S. Color reaction between Pyrogallol Red-

Molybdenum (VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku* 1983;32:379–86.

[86] KOERBIN G, TAYLOR L, DUTTON J, MARSHALL T, LOW P, POTTER JM. Aminoglycoside interference with the Dade Behring Pyrogallol red-molybdate method for the measurement of total urine protein. *Clin Chem* 2001;47:2183–8.

[87] MARSHALL T, WILLIAMS KM. Total protein determination in urine : aminoglycoside interference. *Clin Chem* 2003;49:202–3.

[88] MARSHALL T, WILLIAMS KM. Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the Coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assays. *Clin Chem* 2000;46:392–8.

[89] LE BRICON T. Exploration biologique de la protéinurie au laboratoire d'analyses : aspects quantitatifs. *Ann Biol Clin (Paris)* 2001;59:701–15.

[90] BOISSON RC, EYNARD JC, CROZIER M, GRAFMEYER DC. French experience of quality assessment of quantitative urinary analysis. *Clin Chim Acta* 2000;297:285–95.

[91] GUDER WG, BOISSON RC, FOGAZZI G, GALIMANY R, KOURI T, MALAKHOV VN, et al. External quality assessment of urine analysis in Europe: Results of a round table discussion during the Symposium "From Uroscopy to Molecular Analysis", Seon, Germany, September 18–20, 1999. *Clin Chim Acta* 2000;297:275–84.

[92] Dosage des protéines urinaires totales : étude comparative des techniques automatisées à l'acide trichloracétique et au rouge de pyrogallol pour les échantillons contenant des chaînes légères monoclonales n.d.

[93] WILLIAMS KM, MARSHALL T. Protein concentration of cerebrospinal fluid by precipitation with Pyrogallol Red prior to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods* 2001;47:197–207.

[94] TABARU H, FINCO DR, BROWN SA, COOPER T. Influence of hydration state on renal functions of dogs. *Am J Vet Res* 1993;54:1758–64.

[95] BLLIJENBERG BG, BROUWER HJ, KULLER TJ, LEENEMAN R, LEEUWEN CJM. Improvements in Creatinine Methodology : A Critical Assessment. *Clin Chem Lab Med* 2009;32:529–38.

[96] HANSER AM, HYM B, MICHOTEY O. Comparaison des méthodes de dosage de la créatinine sérique. *Ann Biol Clin (Paris)* 2001;59:737–42.

[97] ZATELLI A, PALTRINIERI S, NIZI F, ROURA X, ZINI E. Evaluation of a urine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *Am J Vet Res* 2010;71:235–40.

[98] OSBORNE CA, FINCO. Evaluation of renal functions. *Canine Feline Nephrol. Urol.*, 1995, p. 216–29.

[99] POLZIN DJ, BARTGES J. Proteinuria and microalbuminuria. *Nephrol. Urol. Small Anim.*, 2011.

[100] RUSSO EA. Assesment of proteinuria in the dog and cat. *Curr. Vet. Ther. IX Small Anim. Pr. KIRK RW*, 1986, p. 1111–4.

[101] GORRIZ JL, MARTINEZ-CASTELAO A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. *Transplant Rev* 2012;26:3–13.

[102] GRAUER GF. Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Top Companion Anim Med* 2011;26:121–7.

- [103] PAGES JP, TROUILLET JL. Les protéinuries. *Prat Médicale Chir Anim Cie* 1990;25:585–97.
- [104] WELLES EG, WHATLEY EM, HALL AS, WRIGHT JC. Comparison of Multistix PRO dipsticks with other biochemical assays for determining urine protein (UP), urine creatinine (UC), and UP: UC ratio in dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 2006;35:31–6.
- [105] DE LOOR J, DAMINET S, SMETS P, MADDENS B, MEYER E. Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury in Dogs. *J Vet Intern Med* 2013;27:998–1010.
- [106] BROWN S, ELLIOTT J. Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease of Dogs. *J Vet Intern Med* 2013;27:27–43.
- [107] FINCO DR, Brown SA, Brown CA, Crowell WA, Cooper TA, Barsanti JA. Progression of chronic renal disease in the dog. *J Vet Intern Med* 1999;13:516–28.
- [108] JACOB F, POLZIN DJ, OSBORNE CA. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc* 2005;226:393–400.
- [109] SYME HM, MARKWELL PJ, PFEIFFER D, ELLIOTT J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *J Vet Intern Med* 2006;20:528–35.
- [110] JAFAR T.H., STARK P.C., SCHMID C.H., LANDA M., MASCHIO G., MARCANTONI C., et al. Proteinuria as a modifiable risk factor for the progression of non-diabetic renal disease. *Kidney Int* 2001;60:1131–40.
- [111] RUGGENENTI P, PERNA A, GHERARDI G, GARINI G, ZOCCALI C, SALVADORI M, et al. Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria. *The Lancet* 1999;354:359–64.
- [112] LEWIS EJ, HUNSICKER LG, CLARKE WR, BERL T, POHL MA, LEWIS JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:851–60.
- [113] MIZUTANI H, KOYAMA H, WATANABE T, KITAGAWA H, NAKANO M, KAJIWARA K, et al. Evaluation of the clinical efficacy of benazepril in the treatment of chronic renal insufficiency in cats. *J Vet Intern Med* 2006;20:1074–9.
- [114] ABBATE M, ZOJA C, REMUZZI G. How Does Proteinuria Cause Progressive Renal Damage? *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2974–84.
- [115] GRODECKI KM, GAINS MJ, BAUMAL R, OSMOND DH, COTTER B, VALLI VEO, et al. Treatment of X-linked hereditary nephritis in Samoyed dogs with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. *J Comp Pathol* 1997;117:209–25.
- [116] KING JN, TASKER S, GUNN-MOORE BA. Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2007;21:906–16.
- [117] ABBATE M, REMUZZI G. Proteinuria as a mediator of tubulo-interstitial injury. *Kidney Blood Press Res* 1999;22:37–46.
- [118] JOLES JA, STROES ES, RABELINK TJ. Endothelial function in proteinuric renal disease. *Kidney Int* 1999;71:57–61.
- [119] RUGGENENTI P, REMUZZI G. The role of protein traffic in the progression of renal diseases. *Annu Rev Med* 2000;51:315–27.
- [120] SHEERIN NS, SACKS SH. Chronic interstitial damage in proteinuria. Does

- complement mediate tubulointerstitial injury ? *Kidney Blood Press Res* 1999;22:47–52.
- [121] ZOJA C, BENIGNI A, REMUZZI G. Protein overload activates proximal tubular cells to release vasoactive and inflammatory mediators. *Exp Nephrol* 1999;7:420–8.
- [122] GRAUER GF. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005;35:581–96.
- [123] PISONI R, RUGGENENTI P, REMUZZI G. Renoprotective therapy in patients with nondiabetic nephropathies. *Drugs* 2001;61:733–45.
- [124] SHEERIN NS, SACKS SH. Chronic interstitial damage in proteinuria. *Kidney Blood Press Res* 1999;22:47–52.
- [125] TANG S, LAI KN, SACKS SH. Role of complement in tubulointerstitial injury from proteinuria. *Kidney Blood Press Res* 2002;25:120–6.
- [126] BURTON C, HARRIS KPG. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1996;27:765–75.
- [127] JENSEN AL, KJELGAARD-HANSEN M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 2006;35:276–86.
- [128] DEFONTIS M, BAUER N, FAILING K, MORITZ A. Automated and visual analysis of commercial urinary dipsticks in dogs, cats and cattle. *Res Vet Sci* 2013;94:440–5.
- [129] WELLES EG, WHATLEY EM, HALL AS, WRIGHT JC. Comparison of Multistix PRO dipsticks with other biochemical assays for determining urine protein (UP), urine creatinine (UC), and UP: UC ratio in dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 2006;35:31–6.
- [130] BAUER N, RETTIG S, MORITZ A. Evaluation the Clinitek status™ automated dipstick analysis device for semiquantitative testing of canine urine. *Res Vet Sci* 2008;85:467–72.
- [131] KOURI T, NOKELAINEN P, PELKONEN V, KOSAKA H, SAEGER B. Evaluation of the ARKRAY AUTION Eleven® reflectometer in detecting microalbuminuria with AUTION Screen dipsticks and proteinuria with AUTION Sticks 10PA® strips. *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69:52–64.
- [132] ROTA C, BIONDI A, TRENTI T. Evaluation of Aution Max AX-4030 and 9UB Uriflet, 10PA Aution Sticks urine dipsticks in the automated urine dipstick analysis. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:139–46.
- [133] RUMLEY A. Urine dipstick testing: Comparison of results obtained by visual reading and with the Bayer CLINITEK 50. *Ann Clin Biochem* 2000;37:220–1.
- [134] LAVOUÉ R, VAN DER LUGT JJ, DAY MJ, GEORGES M, BUSONI V, MERVEILLE AC, et al. Progressive Juvenile Glomerulonephropathy in 16 Related French Mastiff (Bordeaux) Dogs. *J Vet Intern Med* 2010;24:314–22.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

Je soussignée, **Catherine TRUMEL**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **NADAUD Carole** intitulée « *Evaluation d'une nouvelle méthode de mesure du RPCU canin à partir d'urines recueillies sur papier absorbant* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



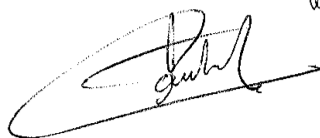
Fait à Toulouse, le 12 mai 2014  
Professeure **Catherine TRUMEL**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur **Alain**



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



le 20.05.2014

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



le 23/05/2014

**Mlle NADAUD Carole**  
a été admis(e) sur concours en : 2008  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012  
a validé son année d'approfondissement le : 10/07/2013  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Ecole nationale vétérinaire - 11, chemin des capelles - 31076 Toulouse cedex 3 - France

## Annexe 1 : Imprécision du dosage des protéines urinaires par le rouge de pyrogallol (synthèse bibliographique)

Études	Nature des CV	Caractéristiques des spécimens/solutions de contrôle utilisés	Valeur des CV
<b>Watanabe et al, 1986</b>	intra-essai	40 spécimens Concentration moyenne en protéines de 0,8g/L	<3,3%
	inter-essais	Idem	2,9%
<b>Orsonneau et al, 1989</b>	intra-essai	0,086g/L	9,26%
		1,173g/L	1,71%
	inter-essais	1,924g/L	1,48%
		Urine de contrôle à 0,136g/L de protéines	12,5%
<b>Fiorina et al, 2001</b>	intra-essai	28 spécimens Urine de contrôle (niveau 1)	3,7%
		28 spécimens Urine de contrôle (niveau 2).	1,4%
	inter-essais	4 spécimens Concentration en protéines comprise entre 0,128g/L et 0,74g/L	Entre 1,2 % et 6,2 %
		2 spécimens de concentrations en protéines égales à 0,24 et 0,74 g/L	Entre 1,3 % à 3,7 %
<b>Behr et al, 2003</b>	intra-essai	28 essais indépendants	
		Albumine à 0,1g/L	7,2%
		Albumine à 1g/L	2,1%
	inter-essais	Globulines à 0,1g/L	6,2
		Globulines à 0,1g/L	1,5%
		LCR à 0,33g/L de protéines	1,6%
inter-essais	idem	4,4%	
<b>Rossi et al, 2012</b>	intra-essai	25 spécimens d'urines	8,3%, IC 95% = [1,9-29,7]


Le CV intra-essai a été estimé à 7,2% et 2.1% pour des solutions d'albumine à 0,1 et 1,0 g/L respectivement, et à 6,2 et 1,5 % pour des solutions de globulines à la même concentration [4]. Bien que ces résultats concernent un LCR (à 0,33 g/L de protéines) et non des urines, il

est intéressant de préciser que dans ce cas, le CV intra-essai a été estimé à 1,6 % et le CV inter-essais à 4,4 %. Une autre étude plus ancienne (1986) qui comparait la méthode au rouge de pyrogallol à celle du Biuret pour mesure la protéinurie a quand à elle obtenu un CV intra-essai inférieur à 3,3% et un CV inter-essais de 2,9% (à partir de 40 spécimens présentant une concentration moyenne en protéines des spécimens de 0,8 g/L) [2].

Dans une autre étude, le CV intra-essai a été calculé à 3 niveaux : pour une concentration moyenne en protéines de 0,086g/L, le CV était égal à 9,26%, à 1,173g/L le CV était de 1,71% et pour une concentration moyenne en protéines de 1,924g/L, le CV était de 1,48% [3].

La précision inter-essais (à partir de 2 urines de contrôle) a quant à elle était calculée égale à 12,5 % pour une urine présentant une concentration moyenne en protéines de 0,136g/L et égale à 7,8% pour une urine avec une concentration moyenne en protéines de 0,348g/L [3].

Un contrôle de qualité quotidien avec deux urines de contrôle de deux niveaux différents a permis d'observer des CV de 3,7% (niveau 1) et de 1,4% (niveau 2) sur 28 spécimens [10]. Par ailleurs, dans cette même étude, la répétabilité (CV intra-séries) a été évaluée à partir de 4 échantillons dont la concentration protéique était comprise entre 0,128 et 0,74g/L. De la même façon, la reproductibilité (CV inter-séries) a été évaluée à partir des résultats obtenus avec deux spécimens de concentrations égales à 0,24 et 0,74 g/L au cours de 28 essais indépendants. Finalement, les CV observés lors des essais de répétabilité varient entre 1,2 % et 6,2 %, et ceux des essais de reproductibilité de 1,3 % à 3,7 % [10]. Cette étude rapporte aussi des dispersions inter-laboratoires lors du Contrôle National de Qualité des laboratoires d'humaine en 1997 importants (CV inter-laboratoires tronqués à 13.5% pour les valeurs basses, 12.2% pour les valeurs hautes) [10]. Par ailleurs, le CV intra-essai pour la concentration en protéines urinaires calculé dans une étude portant sur la variabilité analytique du RPCU est de 8,3%, IC 95% = [1,9-29,7] [20].

	<p style="text-align: center;"><b>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée</b> ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 831; mail c.trumel@envt.fr</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>Annexe n° 2 :</u></b> <b>Formulaire de</b> <b>consentement</b> <b>éclairé</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>Détermination du RPCU chez le chien à partir de spécimens collectés sur papier absorbant</b></p>		

Étude effectuée au LCBM de l'hôpital de l'ENVT entre février et Juillet 2012.

Le but de cette étude est de comparer les résultats de mesure du rapport de protéines urinaires sur la créatinine urinaire (RPCU) dans des spécimens d'urines fraîches ou stockées sur papier absorbant séché à l'air libre. Ces derniers sont analysés après des durées variables après lavage et récupération de la solution de lavage. L'intérêt de cette méthode alternative de mesure du RPCU se justifie par le fait :

- Qu'envoyer ainsi par la poste des urines recueillies sur papier absorbant par le propriétaire à son domicile, simplifierait le dépistage et le suivi de chiens prédisposés à développer des affections rénales telles que des glomérulopathies,
- Que cela permettrait de limiter les biais analytiques liés aux méthodes et machines en centralisant l'envoi de tous les prélèvements vers un même laboratoire de référence.

**Aucun acte invasif n'est réalisé sur les animaux inclus, les urines sur lesquelles sont réalisées les analyses sont récupérées par miction spontanée lors d'une sortie en compagnie du chien.**

Je, soussigné(e) .....

Propriétaire du (des) chien(s) :

.....  
.....

**Atteste avoir lu les paragraphes précédents et avoir accepté que les urines de mon (mes) chien(s) puissent être utilisées dans le cadre de cette étude.**

**Atteste avoir été clairement informé du caractère facultatif de cette étude et avoir conscience de ma totale liberté de refuser que mon chien y participe.**

À .....

le

Signature :



## Annexe 3 : Réactif rouge de pyrogallol (dosage des protéines urinaires)



PROTEIN u:csf

### Protein in urine and CSF

Pyrogallol red. Colorimetric

#### Quantitative determination of total urinary and CSF protein IVD

Store at 2-8°C

#### PRINCIPLE OF THE METHOD

Protein react in acid solution with pyrogallol red and molybdate to form a colored complex. The intensity of the color formed is proportional to the protein concentration in the sample<sup>1,2</sup>.

#### CLINICAL SIGNIFICANCE

In healthy persons, the urine contains no protein or only a trace amount of protein; normally the glomeruli prevent passage of protein from the blood to the glomerular filtrate. Glomerular injury causes increased permeability to plasma proteins, resulting in proteinuria, which refers to the presence of protein in the urine. A persistent finding of proteinuria is the single most important indication of renal disease. Elevated concentration of protein in cerebro-spinal fluid (CSF) can be caused by infections and intracranial pressure<sup>1,3,4</sup>. Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

#### REAGENTS

R	Pyrogallol red	50 mmol/L
	Sodium molybdate	0.04 mmol/L
µ PROTEIN CAL	Albumin/Globulin aqueous primary standard	1000 mg/L

#### PREPARATION

The reagents are ready to use.

#### STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.  
Signs of reagent deterioration:  
- Presence of particles and turbidity.  
- Blank absorbance (A) at 598 nm  $\approx$  0.30.

#### ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 598 nm.  
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.  
- General laboratory equipment.

#### SAMPLES

- Urine 24 h: Stability 8 days at 2-8°C.  
- Cerebrospinal fluid (CSF): Stable 4 days at 2-8°C.

#### PROCEDURE

- Assay conditions:  
Wavelength: ..... 598 nm  
Cuvette: ..... 1 cm light path  
Temperature: ..... 37°C / 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard <sup>(1)(2)</sup> (µL)	--	20	--
Sample (µL)	--	--	20

- Mix and incubate for 5 min at 37°C or 10 min at room temperature (15-25°C).
- Read the absorbance (A) of the samples and Standard, against the Blank. The color is stable for at least 30 minutes.

#### CALCULATIONS

Urine 24 h  
 $\frac{(A)_{\text{Sample}}}{(A)_{\text{Standard}}} \times 1000 (\text{Standard conc.}) \times \text{vol. (L) urine 24 h} = \text{mg protein/24 h}$

#### CSF

$\frac{(A)_{\text{Sample}}}{(A)_{\text{Standard}}} \times 1000 (\text{Standard conc.}) = \text{mg/L protein in the sample}$

#### QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

#### REFERENCE VALUES<sup>5</sup>

Urine: < 100 mg/24 h (< 150 mg/24 h in pregnancy)  
Children 300 - 1000 mg/L  
Adults 150 - 450 mg/L

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: Up to linearity limit of 4000 mg/L.  
If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.  
Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).  
The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

#### INTERFERENCES

Hemolysis<sup>1,2</sup>.  
A list of drugs and other interfering substances with protein determination has been reported by Young et al.<sup>3,4</sup>.

#### NOTES

- µ PROTEIN CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

#### BIBLIOGRAPHY

- Orsonneau JL et al. An improved Pyrogallol Red-Molybdate Method for Determining Total Urinary Protein. Clin Chem 1989 (35):2233-2236.
- Koller A. Total serum protein. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1316-1324 and 418.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

#### PACKAGING

Ref: 1001025  Cont. 2 x 150 mL

BSIS29-I Ed.2007



SPINREACT,S.A.U. C/ra.Santa Coloma, 7 E-11176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN  
Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99. e-mail: spinreact@spinreact.com



**CREATININE :  
MONO REACTIF LIQUIDE  
STABLE PAE**

RMF: J04-KKREZ125A  
Flacon de 125ml

KITVIA

**UTILISATION**

Pour la détermination quantitative de la créatinine dans le sérum et l'urine, sur des appareils d'analyses.

**RÉSUMÉ ET EXPLICATION**

La mesure de la créatinine est utilisée dans le diagnostic et le maintien des fonctions rénales, notamment lors de surveillance de dialyses rénales, et comme base de calcul pour la mesure d'autres composants de l'urine. Des taux élevés de créatinine sont retrouvés lors de maladies ou insuffisances rénales, avec baisse de la filtration glomérulaire (urémie ou azotémie dans les cas graves) ; obstruction des voies urinaires ; réduction du flux sanguin rénal avec insuffisance cardiaque congestive, choc et déshydratation.

**MÉTHODE**

En 1986, Jaffé décrit une méthode pour quantifier la créatinine, impliquant une réaction avec l'acide picrique dans une solution alcaline. Bien que plusieurs méthodes aient été décrites depuis, la méthode Jaffé est encore la plus utilisée. Cette réaction est sujette à interférences par certaines substances, notamment les protéines et le glucose. Des modifications de la procédure ont été développées pour éviter ces inconvénients. Les procédures « cinétiques » sont mieux adaptées car elles sont rapides, simples et évitent les interférences. La méthode suivante, basée sur une modification de la procédure citée plus haut, comprend un surfactant ainsi que d'autres éléments pour minimiser les interférences avec les protéines et les hydrates de carbone.

**PRINCIPE**

Solution

Créatinine + Picrate de  $\longrightarrow$  Complexe créatinine-picrate  
(Jaune orangé)

La créatinine réagit avec l'acide picrique dans des conditions alcalines pour former un complexe qui absorbe à 510 nm. Le taux de formation de la coloration est proportionnel à la quantité de créatinine dans l'échantillon.

**COMPOSITION DU REACTIF**

Composants	Concentration
Acide picrique	10 mM
Hydroxyde de sodium	250 mM
pH	13.0 ± 0.2

**PRECAUTIONS**

- Pour diagnostiquer in vitro uniquement.
- L'acide picrique est un agent oxydant puissant. Eviter tous contacts avec le peau et éliminer toute échoussure éventuelle.
- DESVOLATILISATION DE L'ACIDE PICRIQUE PEUT PROVOQUER DES EXPLOSIONS.**  
L'hydroxyde de sodium est une solution alcaline. Eviter l'ingestion et le contact.

**PREPARATION DU REACTIF**

Le réactif est prêt à l'emploi et stable jusqu'à sa date de péremption.

**CONSERVATION DU REACTIF**

- Le réactif doit être conservé au frais (2 à 8°C).
- Dans ces conditions il reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Le réactif doit être protégé de la lumière lorsqu'il n'est pas utilisé.

**DETERIORATION DU REACTIF**

**NE PAS UTILISER LE REACTIF SI :**

- Le réactif est contaminé.
- Le réactif ne donne pas les performances attendues lors des contrôles.
- L'absorbance du réactif initial est plus élevée que 0.330 à 500-510 nm.

**COLLECTE ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS**

- Un sérum non hémolysé est recommandé.
- L'urine doit être diluée à une concentration finale d'approximativement 34 à 64 mg/dL. Une dilution au 1 : 10 est recommandée.
- La créatinine est stable dans le sérum pendant 7 jours s'il est conservé au frais (2-8°C) et pendant plusieurs mois s'il est congelé (-20°C) et protégé de l'évaporation et de la contamination. Les échantillons d'urine sont stables pendant au moins 7 jours à 4°C.

**INTERFERENCES**

- Des études pour déterminer le niveau d'interférence de l'hémoglobine, bilrubine, et lipéine ont été réalisées, les résultats suivant ont été obtenus :  
**Hémoglobine :** Pas d'interférence significative de l'hémoglobine jusqu'à 200 mg/dL.  
**Bilrubine :** Pas d'interférence significative de la bilirubine jusqu'à 10.5 mg/dL.  
**Lipéale :** Pas d'interférence significative de la lipéine jusqu'à 618 mg/dL.  
Un certain nombre de drogues et de substances peuvent affecter la précision de la créatinine. (Young et al)
- 

**EQUIPEMENT COMPLEMENTAIRE REQUIS MAIS NON FOURNI**

- Un appareil d'analyse capable de maintenir une température constante (37°C) et de mesurer l'absorbance à 510nm (500-510nm)
- De l'eau distillée et l'équipement allant avec (ex : pipettes...)
- Les consommables pour l'appareil d'analyse (ex : cuve à échantillons...)
- Le matériel de contrôle et de calibration comme celui fourni par KITVIA (réf: S02-1002121 et S02-1002112).

**PROCEDURE DE TEST**

TEMPERATURE	37°C
LONGUEUR D'ONDE	510 nm
TYPE DE TEST	2 points
REACTION	Croisante
RATIO ECHANTILLON/REACTIF	1:10
Ex : volume d'échantillon	0,1 mL (100µL)
Ex : volume de réactif	1,0 mL
PREMIER TEMPS DE LECTURE	60sec
DELTA	120sec
DERNIER TEMPS DE LECTURE	180sec

**NOTES SUR LA PROCEDURE**

- Les volumes de réactif et d'échantillons peuvent être modifiés en fonction de différents instruments utilisés.

Calcul : (A÷ Absorbance)

A du patient x Concentration standard = Créatinine (mg/dL)  
A standard

Exemple:

A du patient = 0.01  
A standard = 0.05  
Concentration standard = 5mg/dL  
0.01 x 5 = 1.0 mg/dL créatinine  
0.05

**LIMITES**

Les échantillons dont les valeurs sont supérieures à 20 mg/dL doivent être dilués au 1/2 avec une solution saline, testés à nouveau, et le résultat final devra être multiplié par 2.

**CALIBRATION**

Utiliser une solution aqueuse standard de créatinine ou un sérum de calibrage approprié.

**CONTROLE QUALITE**

L'intégrité du réactif doit être surveillée au moyen d'un contrôle à deux niveaux avec des valeurs de créatinine connues.

**VALEURS ATTENDUES**

Sérum : 0.50 – 1.40 mg/dl  
Urine : 0.80 – 2.09 g/ jour  
Il est fortement recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres gammes de références.

**PERFORMANCES**

**Linéarité :**

Dans les bonnes conditions, le test est linéaire de 0 à 20 mg/dL.

**Comparaison des méthodes :**

Des études comparatives réalisées entre cette procédure et une méthodologie similaire ont donné les résultats suivants :

	Sérum	Urine
Nombre de paires d'échantillons	45	44
Gamme	0,2-24,6 (mg/dL)	17-355 (mg/dL)
Coefficient de corrélation	0,999	0,9952
Pente	1,02	1,04
Ordonnées à l'origine	-0,00 (mg/dL)	-0,30 (mg/dL)
<b>Précision :</b>		
Intra run	Niveau 1	Niveau 2
Moyenne	1,62	4,81
S.D (mg/dL)	0,05	0,10
C.V (%)	3,2	2,1
Inter run		
Moyenne	1,62	4,81
S.D (mg/dL)	0,05	0,10
C.V (%)	3,2	2,1

KITVIA - 5, zone Perhoest - 31800 LABARTHE INVAUD - Tél : 33 (0)5 61 88 88 54 - Fax : 33 (0)5 61 88 88 55 - www.kitvia.com - E-mail : kitvia@kitvia.fr



# Annexe 5 : Liquichek Urine Chemistry Control niveaux 1 et 2

**BIO-RAD**

## Liquichek™ Urine Chemistry Control Levels 1 and 2

REF	397	Level 1	12 x 10 mL
	398	Level 2	12 x 10 mL
	395X	Bilevel MiniPak	2 x 10 mL



EXP 2009-09-30

LOT	62840	Level 1	62841
		Level 2	62842

**ENGLISH**

**INTENDED USE**

Liquichek Urine Chemistry Control is intended for use as an assayed quality control urine to monitor the precision of laboratory testing procedures for the analytes listed in this package insert.

**SUMMARY AND PRINCIPLE**

The use of quality control materials is indicated as an objective assessment of the precision of methods and techniques in use and is an integral part of good laboratory practices. Two levels of control are available to allow performance monitoring within the clinical range.

**REAGENT**

This product is prepared from human urine with added constituents of human and animal origin, chemicals, preservatives and stabilizers. The control is provided in liquid form for convenience.

**STORAGE AND STABILITY**

This product will be stable until the expiration date when stored unopened at 2 to 8°C. Once the control is opened, all analyses will be stable for 30 days when stored tightly capped at 2 to 8°C.

This product is shipped under refrigerated conditions.

**PROCEDURE**

This product should be treated the same as patient specimens and run in accordance with the instructions accompanying the instrument, kit, or reagent being used.

Before sampling, allow the control to reach room temperature (18 to 25°C) and swirl gently to ensure homogeneity.

Dispose of any discarded materials in accordance with the requirements of your local waste management authorities. In the event of damage to packaging, contact the local Bio-Rad Laboratories Sales Office or Bio-Rad Laboratories Technical Services.

**LIMITATIONS**

1. This product should not be used past the expiration date.
2. If there is evidence of microbial contamination or excessive turbidity in the product, discard the vial.
3. Creatinine values may gradually decrease over the product shelf life. Individual laboratory means may eventually fall outside of the corresponding ranges printed in this insert.
4. This product is not intended for use as a standard.

**ASSIGNMENT OF VALUES**

The mean values printed in this insert were derived from replicate analyses and are specific for this lot of product. The tests listed were performed by the reagent manufacturer and/or independent laboratories using manufacturer supplied reagents and a representative sampling of this lot of control. Individual laboratory means should fall within the corresponding acceptable range; however, laboratory means may vary from the listed values during the life of this control. Variations over time and between laboratories may be caused by differences in laboratory technique, instrumentation and reagents, or by manufacturer test method modifications. It is recommended that each laboratory establish its own means and acceptable ranges and use those provided only as guides.

**SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

This product is a stabilized liquid product manufactured under rigid quality control standards. To obtain consistent vital-vital assay values, the control requires proper storage and handling as described.

**DEUTSCH**

**VORGESCHENDE VERWENDUNGSZWECK**

Die Liquichek Urine Chemistry Control dient als Qualitätskontrollurin für die quantitative Bestimmung der in diesem Datenblatt angegebenen Methoden.

**EINLEITUNG UND ZUSAMMENFASSUNG**

Die Verwendung von Qualitätskontrollmaterialien dient der objektiven Beurteilung der Qualität von im Labor durchgeführten Methoden und Techniken und ist ein unverzichtbarer Bestandteil der guten Laborpraxis. Die zwei Level dieser Kontrolle ermöglichen eine umfassende Qualitätskontrolle über den gesamten klinisch relevanten Bereich.

**REAGENZ**

Das Produkt ist aus Humanurin mit Zusätzen von Bestandteilen menschlichen und tierischen Ursprungs, Chemikalien sowie Stabilisatoren und Konservierungsmitteln hergestellt. Die Kontrolle ist gebrauchsfähig, flüssig und dadurch sehr einfach in der Anwendung.

**LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

Dieses Produkt ist bis zum angegebenen Verfalldatum stabil, wenn es ungeöffnet bei 2-8°C gelagert wird. Nach dem Öffnen sind alle Analysen 30 Tage stabil, wenn die Kontrolle fest verschlossen bei 2-8°C aufbewahrt wird.

Dieses Produkt wird gekühlt versandt.

**HANDHABUNG**

Das Produkt ist genau wie eine Patientenprobe zu behandeln und in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Geräte-, Kit-, oder Reagenzienherstellers anzuwenden.

Vor der Anwendung sollte die Kontrolle auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden und vorsichtig durchgemischt werden um die Homogenität zu gewährleisten.

Die Entsorgung aller Abfälle ist nach den geltenden lokalen Abfallbestimmungen vorzunehmen. Falls die Verpackung beschädigt ist, nehmen Sie Kontakt zur Bio-Rad Niederlassung auf.

**EINSCHRÄNKUNGEN**

1. Das Produkt nicht nach dem angegebenen Verfalldatum verwenden.
2. Sollte die Kontrolle Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination oder eine starke Trübung aufweisen, ist sie zu verworfen.
3. Es kann sein, dass die Kreatinin-Werte im Laufe der Zeit abfallen. Es kann deswegen dazu kommen, dass die vom jeweiligen Labor gefundenen Mittelwerte außerhalb des in diesem Datenblatt angegebenen zulässigen Bereichs liegen.
4. Dieses Produkt ist nicht zur Verwendung als Standardmaterial vorgesehen.

**WERTEERMITTLUNG**

Die in dieser Produktbeilage angegebenen Mittelwerte stammen aus Vielfachbestimmungen und gelten speziell für diese Produktcharge. Die angegebenen Tests wurden von den Reagenzienherstellern und/oder von unabhängigen Laboratorien mit vom Hersteller unterstützten Reagenzien durchgeführt. Dazu wurde eine repräsentative Stichprobe an Flüssigkeiten eingesetzt. Die Mittelwerte der einzelnen Labors sollten im entsprechenden Akzeptanzbereich liegen. Die tatsächlich erzielten Mittelwerte können jedoch im Verlauf der Lebensdauer dieser Kontrolle von den angegebenen Werten abweichen. Abweichungen im Laufe der Zeit und zwischen verschiedenen Laboratorien sind möglicherweise auf unterschiedliche Labortechniken, Geräte und Reagenzien oder auf Modifikationen der Testmethoden durch die Hersteller zurückzuführen. Jedem Labor wird empfohlen eigene Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln und die hier aufgeführten lediglich als Richtwerte zu betrachten.

**SPEZIFISCHE EIGENSCHAFTEN**

Diese Kontrolle ist ein stabilisiertes, flüssiges Produkt, das nach strengen Qualitätsstandards hergestellt wurde. Richtig und präzise Ergebnisse erfordern sachgerechte Lagerung und Handhabung wie angegeben.

**FRANÇAIS**

**UTILISATION**

Le Liquichek Urine Chemistry Control est destiné à être utilisé comme urine de contrôle de qualité dosée pour la surveillance de la précision des protocoles d'analyse en laboratoire pour les analytes indiqués sur cette notice.

**INTRODUCTION ET PRINCIPE**

L'utilisation de substances de contrôle de la qualité est indiquée comme une évaluation objective de la précision des méthodes et techniques en vigueur et fait partie intégrante des bonnes pratiques de laboratoire. Deux niveaux de contrôle sont disponibles pour surveiller la performance dans la plage clinique.

**REACTIF**

Ce produit a été préparé à partir d'urine humaine à laquelle ont été ajoutés des constituants d'origine humaine et animale, des produits chimiques et des agents de conservation et de stabilisation. Le contrôle se présente sous forme liquide.

**CONSERVATION ET STABILITE**

Ce produit est stable jusqu'à sa date de péremption lorsqu'il est conservé non ouvert entre 2 et 8°C. Une fois contrôlé ouvert, tous les analytes sont stables pendant 30 jours s'ils sont conservés bien bouchés entre 2 et 8°C.

Ce produit est expédié sous conditions de réfrigération.

**MODE OPERATOIRE**

Ce produit doit être traité de la même façon que les échantillons patient et conformément aux instructions jointes à l'appareil, à la trousse ou au réactif utilisés.

Avant d'effectuer l'échantillonnage, attendre que le contrôle soit à température ambiante (entre 18 et 25°C) et secouer le flacon avec précaution pour garantir une bonne homogénéité.

Éliminer toute substance à mettre au rebut conformément aux règlements en vigueur des organismes de gestion des déchets. Si l'emballage a été endommagé, contacter le bureau de vente local ou le service technique de Bio-Rad Laboratories.

**LIMITES**

1. Ne pas utiliser ce produit au-delà de la date de péremption.
2. Si le produit est trouble ou semble avoir été exposé à des contaminations microbiennes, jeter le flacon.
3. Les valeurs de créatinine peuvent s'affaiblir graduellement au cours de la conservation et les moyennes des laboratoires individuels peuvent finir par se trouver hors des plages correspondantes indiquées sur cette notice.
4. Ce produit n'est pas conçu pour être utilisé comme étalon.

**DETERMINATION DES VALEURS**

Les valeurs moyennes figurant sur cette notice sont le résultat de dosages répétés et sont spécifiques de ce lot de produit. Les tests indiqués ont été effectués par le fabricant de réactif et/ou des laboratoires indépendants en se servant de réactifs validés par le fabricant et d'un échantillonnage représentatif de ce lot de contrôle. Les moyennes individuelles doivent se trouver dans la plage acceptable correspondante; cependant, elles peuvent varier pendant la durée de vie du contrôle. Les variations dans le temps et entre les laboratoires peuvent résulter des différences de techniques, d'appareils et de réactifs employés, ou provenir de modifications de méthodes de test du fabricant. Il est recommandé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs moyennes et plages acceptables, et de ne se servir de celles qui sont fournies qu'à titre indicatif.

**CHARACTERISTIQUES**

Il s'agit d'un liquide stabilisé qui est fabriqué selon des normes de contrôle de qualité très strictes. Pour obtenir des valeurs de dosage homogènes d'un flacon à l'autre, le contrôle doit être conservé et manipulé conformément aux présentes instructions.

<p>For In Vitro Diagnostic Use In vitro Diagnostisch Usage in Vitro Für den Diagnostischen Nutzung In Vitro Utilisation In Vitro Für In Vitro Diagnostik In Vitro Diagnostisch</p>	<p>European Conformity CE Konformitätsbescheinigung Conformité aux normes européennes Conformidade Europeia Conformidad Europea Conformidade Europeia Conformidade Europeia Conformidade Europeia</p>	<p>Temperature Limit Temperaturgrenze Limite de température Limite de temperatura Limite di temperatura Limite di temperatura Temperaturgrenze Temperaturgrenze</p>	<p>Consult Instructions for Use Consultez les notices Consulte a notice (original) Consulte a notice (original) Consulte a notice (original) Consulte a notice (original) Consulte a notice (original) Consulte a notice (original) Consulte a notice (original)</p>	<p>Lot Number Charge No. Número de lote Número de lote Número de lote Número de lote Número de lote Número de lote Número de lote</p>	<p>Use by (YYYY-MM-DD) Valid until (YYYY-MM-DD) Date de péremption (AAAA-MM-JJ) Data de validade (AAAA-MM-JJ) Date of expiry (AAAA-MM-DD) Fecha de caducidad (AAAA-MM-DD) Anvendt til (AAAA-MM-DD) Anvendt til (AAAA-MM-DD)</p>	<p>Manufactured by Herstellt von Fabricado por Fabricado por Fabricado por Fabricado por Fabricado por Fabricado por Fabricado por</p>	<p>Authorized Representative Représentant autorisé Representante autorizada Representante autorizada Representante autorizada Representante autorizada Representante autorizada Representante autorizada Representante autorizada</p>	<p>Stability Period Durée de stabilité Período de estabilidad Período de estabilidad Período de estabilidad Período de estabilidad Período de estabilidad Período de estabilidad Período de estabilidad</p>
--	---	---	--	---	---	--	---	---

Document # D02004-01 Rev 001-01 © 2004-01-01 Bio-Rad Laboratories, Inc. All rights reserved. Printed in the USA.

Toulouse, Juin 2014

Nom : NADAUD

Prénom : Carole

Titre : Évaluation d'une nouvelle méthode de mesure du RPCU canin à partir d'urines recueillies sur papier absorbant.

Résumé : Le manuscrit présente une rapide synthèse bibliographique sur le RPCU canin et notamment ses facteurs de variation pré-analytique et analytique ainsi que ses critères d'interprétation. Le travail expérimental a consisté en la comparaison d'une nouvelle méthode de mesure du RPCU canin à partir d'urines prélevées sur papier absorbant avec la méthode standard sur urines liquides. Cette étude a démontré la faisabilité de cette nouvelle méthode et en a validé les principes et grandes lignes techniques. Celle-ci présente l'intérêt de simplifier et faciliter le suivi d'une protéinurie en permettant aux propriétaires, sur le conseil de leur vétérinaire, de multiplier les collectes et préparer eux-mêmes les spécimens papiers qu'ils enverraient directement au laboratoire de référence, tout en limitant le coût global de la surveillance du RPCU.

Mots-clés : rapport protéines sur créatinine urinaire, RPCU, protéinurie, chien, urines.

---

Title : Assessment of a new measurement method of the canine UPC ratio from urines taken on absorbent paper.

Abstract : In a first part, a short literature review has been carried out on canine UPC ratio and its pre-analytic and analytic factors of variation as well as the criteria for interpretation. In a second part, the study consisted in a comparison of a new method of measurement of the canine UPC ratio on paper with the standard method on liquid urines. This study demonstrated the feasibility of this new method and validated its main principles and technical lines. The major interest of this method is to simplify the repeated measurement of UPC ratio by allowing owners to multiply samples on the advices of the veterinary surgeon and to prepare themselves specimens on papers they would send directly to a reference laboratory, while limiting the global cost of the UPC ratio monitoring.

Keywords : Urine protein creatinine ratio, UPC ratio, proteinuria, dog, urine.