



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

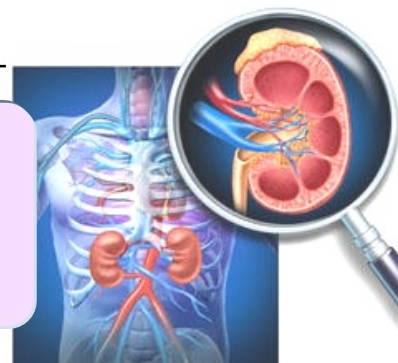
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Analyse Protéomique et Santé*

Intitulé :

**Exploration du protéome salivaire et urinaire
des patients atteints d'une maladie rénale par
application des techniques d'électrophorèse**



Présenté et soutenu par : DJESSAS Hibat Errahmane

Le : 30/06/2015

TALBI Yasmina

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr KHELIFI Douadi (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : Melle BELLIL Inès (Maitre de conférence- UFM Constantine).

Examinatrice : Melle BENHAMDI Asma (Maitre assistante- UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 – 2015*

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadreur Melle BELLIL INES, Maître de conférences pour sa confiance, ses judicieux conseils, ses jugements critiques, son soutien, ses qualités humaines, nous tenons à lui exprimer toute nos gratitude.

Soyez rassuré que vos conseils et recommandations n'ont pas été vaines.

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Nous vous en sommes très reconnaissantes et en espérant être à la hauteur de votre confiance.

Que Prof. HKEELIFI DOUADI, trouve ici l'expression de nos respectueuses gratitude et le témoignage de nos profonds remerciements pour avoir accepté de présider ce jury et avant tout pour avoir accepté de nous accueillir dans son laboratoire pour effectuer ce travail.

Nous remercions également l'examinatrice de ce travail, Maître assistante BENHAMDI ASMA. Nous vous adressons nos sincères remerciements et nos profonds respects pour l'intérêt que vous apportez à ce travail.

Nous tenons à remercier mesdemoiselles les doctorantes MEDOURI ASMA et MEDOUKALI IMENE pour leurs sympathies ainsi que leurs idées constructives, leurs précieux conseils et leur disponibilité au laboratoire.

Nous tenons également à remercier les personnels de l'EHS Daksi en particulier le médecin chef du service de néphrologie pour avoir accepté de nous recevoir pour la collecte des échantillons et consultation des dossiers. Le chef service de néphrologie Mr. BOUBIDI, Dr. BOUNAH, Mr BOUGERZI, Mademoiselle DJAOU, nous avons été très touchés par votre disponibilité et votre abord facile. Nous les remercions pour leur soutien et d'avoir ouvert les portes du laboratoire et du service pour nous afin de réaliser ce travail.

Nos remerciements vont également aux malades rénaux accueillis par le service de néphrologie. Nous leur souhaitons un prompt rétablissement.

Enfin nos remerciements à tous ceux qui ont aidé à l'élaboration de ce mémoire de près ou de loin.

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes chers parents AHMED et FATIMA qui m'ont dirigé et suivi Pendant toute mes années d'étude

A mon très cher père, merci pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir toujours soutenu, pour vos sacrifices, vos prières et pour l'encouragement sans limites que vous ne cessez de m'offrir...

A ma très chère mère, merci pour les sacrifices de tous les instants que tu m'as consenti pour mon éducation et mon bien être, merci de trimer sans relâche, merci pour vos prières, votre soutien dans les moments difficiles, pour votre courage et patience...

Mes chers parents, aucun mot ne pourra exprimer mon immense reconnaissance. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mes sentiments les plus forts, mon profond respect et ma plus grande gratitude.

Que Dieu vous bénisse et vous prête bonne santé et longue vie.

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :

Ma cher grande mère : ZOËRA.

Mon cher grand père : ALI

A mes chers frères : IMED, OKBA et ABD ELDJALILE.

A ma chère sœur : RYM.

Je vous souhaite du bonheur et du succès dans toute votre vie

A mes oncles et mes tantes : DJAMEL, TOUFIK, MAKHLOUHF HANIFA, DJAMILA, LAÏLA, NABILA et CHAFIA

A mes cousins et mes cousines surtout ROUMAÏSSA et RAYANE.

Également je dédie ce travail à mes amies : YASMINA, AHLAM, NOUR, CHAHRA et à tous mes collègues.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

HIBAT ERRAHMANE

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut ...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, à ceux qui me sont les plus chers, à ceux qui ont toujours cru en moi, à ceux qui m'ont toujours encouragé, aussi, c'est tout simplement que

A mes très chers parents

Vous avez été pour moi au long de mes études le plus grand symbole d'amour, de dévouement qui ont ni cessé ni diminué. Votre bonté et votre générosité sont sans limite. Vos prières m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours. J'espère de tout mon cœur qu'en ce jour vous soyez fière de moi, et que je réalise l'un de vos rêves.

Je vous le dédie tout particulièrement. Puisse Dieu vous procurer bonheur, santé, longue vie et vous garder à mes côtés, le plus longtemps possible. Je vous adore

A mes très chers frères MOHAMED RAMZI et NOUR EL ISLAM

Que Dieu vous protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent. Que dieu vous comble de bonheur, de santé, de succès et de prospérité dans votre vie. Je vous adore

A mes chers grands parents

A mes oncles surtout ABD EL LATIF, SALIM

A mes tantes surtout SOUAD et AICHA

A mes cousines ILHAM, FATIMA, YASMINE, KAHINA, AMINA, SAKINA,

A tous les membres de ma famille

A mes très chères amies HIBA, KAOUTHER, SOUMIA, YASMINE, OUDA, SALMA, WASSILA, NAWAL, AHLLEM, CHAHRA, LAMIA, HADJER, INSAF

Aucun mot ne saurait exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance envers vous, que Dieu vous protège



A tous ceux qui me sont chers. Je les remercie pour leur soutien constant, leur aide et leur réconfort durant toutes ces années, qu'ils trouvent dans ce mémoire le témoignage de toute mon affection et de ma profonde reconnaissance.

YASMINA

TABLE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1: projection postérieure des reins (60).....	3
Figure 2: anatomie externe du rein (92).....	3
Figure 3: anatomie interne du rein (37, 97).....	4
Figure 4: rôles de la salive (4).....	13

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 5 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE.....	22
Figure 6 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE.....	24
Figure 7 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices.....	30
Figure 8 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices.....	32
Figure 9 : profils électrophorétiques des protéines urinaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE.....	39
Figure 10 : profils électrophorétiques des protéines urinaires dans les conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE.....	42
Figure 11 : dendrogramme des 19 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices.....	49
Figure 12 : dendrogramme des 19 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices.....	51
Figure 13 : Comparaison des profils électrophorétiques des protéines urinaires et salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE.....	56
Figure 14 : Comparaison des profils électrophorétiques des protéines urinaires et salivaires dans les conditions dénaturantes non réductrices révélées par SDS/PAGE.....	57

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1: concentrations ioniques dans la salive (mol/l sauf pour I et F) (65).....	11
Tableau 2: composition organique de la salive (Concentrations en mg/l sauf où indiquées) (70)	12
Tableau 3: principaux marqueurs des protéinuries pathologiques (56).....	14
Tableau 4 : liste des protéines majoritaires trouvées dans la salive humaine (77).....	16

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 5 : variation des bandes protéiques D1, D2, D3, D4, D5.....	23
Tableau 6 : variation des bandes protéiques D*, D**, D***, D****, D*****	25
Tableau 7 : variabilité des protéines salivaires de HPM.....	26
Tableau 8 : variabilité des protéines salivaires de FPM.....	27
Tableau 9 : variabilité des protéines salivaires de HPM.....	28
Tableau 10 : variabilité des protéines salivaires de FPM.....	29
Tableau 11 : Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	35
Tableau 12 : Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	36
Tableau 13 : variation des bandes protéiques U1, U2, U3, U4, U5.....	40
Tableau 14 : variation des bandes protéiques U', U'', U''', U'''' , U'''''	41
Tableau 15 : variabilité des protéines urinaires de HPM.....	43
Tableau 16 : variabilité des protéines urinaires de FPM.....	45
Tableau 17 : variabilité des protéines urinaires de HPM.....	47
Tableau 18 : variabilité des protéines urinaires de FPM.....	48
Tableau 19 : indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et réduites.....	53
Tableau 20 : Indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et non réduites.....	54

Abréviations

APS :	A mmonium P ersulfate
ARN :	A cides R ibonucléiques
DFG :	D ébit de F iltration G lomérulaire
EGF :	E pithelial G rowth F actor
F :	F luorure
FPM :	F aible P oids M oléculaire
GEM :	G lomérulonéphrite E xtramembraneuse
HPM :	H aut P oids M oléculaire
HTA :	H ypertension A rtérielle
I :	I odure
IAS :	I ndice de S imilarité A bsolu
Ig :	I mmunoglobulines
IRA :	I nsuffisance R énale A iguë
IRC :	I nsuffisance R énale C hronique
IRS :	I ndice de similarité R elative
IRT :	I nsuffisance R énale T erminale
NGF :	N erve G rowth F actor
NTA :	N écrose T ubulaire A iguë
PRP :	P rotéines R iche en P roline
RBP :	R etinol B inding P rotein
SDS-PAGE :	S odium D odecyl S ulfate- P oly A crylamide G el E lectrophoresis
SLPI :	S ecretory L euko p rotease I nhibitor
SN :	S yndrome N éphrotique
TCA :	T richloroacetic A cid
TCP :	T ube C ontourné P roximal
TEMED	N,N,N',N' - T etra m ethyl e thylene d iamide

Table des matières

Table des figures

Table des tableaux

Abréviations

Introduction	1
Chapitre 1 : revue bibliographique.....	3

I. REIN ET PATHOLOGIES RENALES.....3

1. Les reins.....	3
1.1. Situation.....	3
1.2. Anatomie.....	3
1.3. Les fonctions du rein.....	5
2. Principales pathologies rénales.....	6
2.1. Insuffisance rénale.....	6
2.1.1. Insuffisance rénale aiguë.....	7
2.1.2. Insuffisance rénale chronique.....	7
2.2. Syndrome néphrotique.....	8

II. LIQUIDES BIOLOGIQUES.....8

1. L'urine.....	8
1.1. Définition.....	9
1.2. Les caractéristiques de l'urine.....	9
1.3. Les composants des urines.....	9
1.4. Rôle de l'urine.....	9
2. La salive.....	9
2.1. Définition.....	10
2.2. Quelques caractéristiques physico-chimiques de la salive.....	10
2.2.1. Le PH.....	10
2.2.2. La viscosité.....	10
2.2.3. La pression osmotique.....	10

2.3. Composition.....	11
2.3.1. Constituants inorganiques.....	11
2.3.2. Constituants organiques.....	11
2.4. Rôles de la salive.....	13
III. LES BIOMARQUEURS.....	13
1. Définition.....	13
2. Les biomarqueurs d'atteinte rénale.....	14
2.1. Les biomarqueurs urinaires.....	14
2.2. Les biomarqueurs salivaires.....	15
3. L'intérêt des biomarqueurs.....	17
<hr/>	
Chapitre 2 : matériel et méthodes.....	18
1. Matériel.....	18
1.1. Recrutement des patients.....	18
1.2. Recueil de la salive.....	18
1.3. Recueil des urines.....	18
2. Méthodes.....	18
2.1. Extraction des protéines salivaires et urinaires.....	18
2.1.1. Dans des conditions dénaturantes et réductrices.....	18
2.1.2. Dans des conditions dénaturantes et non réductrices.....	19
2.2. Électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	19
2.3. Lecture des électrophorégrammes.....	19
2.4. Analyse statistiques.....	20
<hr/>	
Chapitre 3 : résultats et discussion.....	21
I. Fractionnement des protéines salivaires et recherche de biomarqueurs.....	21
1. Analyse des profils électrophorétiques.....	21
1.1. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE.....	21
1.2. Analyse des protéines salivaires dénaturées et non réduites fractionnées par SDS-PAGE.....	23
2. Etude de la variabilité des protéines salivaires.....	25
2.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	25

2.1.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	25
2.1.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	26
2.2. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et non réduites...	27
2.2.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	27
2.2.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	28
3. Classification hiérarchique des protéines salivaires.....	29
3.1. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	29
3.2. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	32
4. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons.....	34
4.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	34
4.2. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	35
5. Conséquence des différentes atteintes rénales sur le protéome salivaire.....	36
II. Fractionnement des protéines urinaires et recherche de biomarqueurs.....	38
1. Analyse des profils électrophorétiques.....	38
1.1. Analyse des protéines urinaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE.....	38
1.2. Analyse des protéines urinaires dénaturées et non réduites fractionnées par SDS-PAGE.....	41
2. Etude de la variabilité des protéines urinaires.....	43
2.1. Etude de la variabilité des protéines urinaires dénaturées et réduites.....	43
2.1.1. Etude des protéines urinaires de HPM.....	43
2.1.2. Etude des protéines urinaires de FPM.....	44
2.2. Etude de la variabilité des protéines urinaires dénaturées et non réduites.....	46
2.2.1. Etude des protéines urinaires de HPM.....	46
2.2.2. Etude des protéines urinaires de FPM.....	47
3. Classification hiérarchique des protéines urinaires	49
3.1. Dendrogramme des protéines urinaires dénaturées et réduites.....	49
3.2. Dendrogramme des protéines urinaires dénaturées et non réduites.....	50
4. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons.....	52
4.1. Indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et réduites.....	52
4.2. Indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et non réduites.....	53
5. Conséquence des différentes atteintes rénales sur le protéome urinaire.....	54

III. Comparaison des profils protéiques urinaires et salivaires.....56

Conclusion et perspectives.....59

Références bibliographiques

Annexes

Résumé en Français

Résumé en Anglais

Résumé en Arabe



Introduction

« Les os peuvent se briser, Les muscles s'atrophier, Les glandes peuvent tarir, Le cerveau lui-même peut s'endormir Sans mettre en danger la vie. Mais que les reins défaillent Et c'est la mort des os, des glandes et du cerveau... »

W. Homer Smith – Fish to Philosopher (1953)

Le rein est l'un des principaux organes du corps humain qui permet de maintenir à leur valeur normale les constantes physiologiques de l'individu. Il intervient notamment à trois niveaux: élimination des déchets azotés et de nombreuses substances, contrôle de l'équilibre entre les acides et les bases et le métabolisme des électrolytes. Pour de multiples raisons, ces fonctions peuvent être altérées, soit primitivement au cours de nombreuses maladies du rein (infection, cancer...etc.) qui sont actuellement en constante augmentation du fait des conditions de vie des individus (âge, mode de vie, pathologie chronique...etc.), soit secondairement, par retentissement de différentes affections, comme l'hypertension artérielle, le diabète, l'alcool et le tabac ... etc.

La gestion clinique des déficiences rénales (pronostic, diagnostic, mise en place d'une thérapie) reste toujours un problème significatif en clinique. Certains examens apprécient la fonction rénale dans sa globalité. D'autres, plus spécifiques, orientent le diagnostic vers certains types de lésions rénales(78). Des progrès considérables ont été faits ces dernières années dans la connaissance de la physiopathologie rénale et par conséquent dans l'identification de biomarqueurs de la pathologie(40).

Jusqu'ici, les marqueurs d'atteinte rénale peuvent être des anomalies morphologiques, histologiques ou biologiques : protéinurie clinique, albuminurie, hématurie, leucocyturie. En effet, les paramètres cliniques traditionnels sont peu sensibles et non discriminants et indiquent plutôt une déficience fonctionnelle qu'une altération tissulaire sous-jacente. Dans ce contexte, l'identification et le développement de nouveaux biomarqueurs d'atteinte rénale entrepris depuis quelques années, devraient permettre une identification de manière plus précoce, plus spécifique et plus sensible des insuffisances rénales aiguës ou chroniques en clinique et ainsi une meilleure appréhension de la prise en charge de ces déficiences rénales(40). En effet, les biomarqueurs nous permettent d'établir la présence de la maladie chez des personnes qui ne présentent encore que de légers troubles. Il existe 3 types des biomarqueurs pour la maladie rénale en fonction du liquide biologique : biomarqueurs sériques, biomarqueurs urinaires et biomarqueurs salivaires.

La composition en protéine de la salive est le centre d'intérêt de nombreuses investigations ces dernières années. Certaines protéines du sérum sont reconnues comme marqueurs potentiels de maladies et peuvent également être retrouvées dans la salive totale. Ces similitudes entre les protéines du sérum et les protéines salivaires ont

encouragé les chercheurs à considérer la salive comme un fluide de diagnostic pour détecter des signes de pathologie.

Le futur pour le diagnostic de salive repose sur des combinaisons de panels de biomarqueurs utilisés comme outils de dépistage pour améliorer la précision du diagnostic et la spécificité. Un biomarqueur seul peut ne pas suffire comme une source fiable pour permettre aux enquêteurs à définir la pathogenèse sous-jacente de la maladie. L'utilisation de combinaisons de biomarqueurs peut fournir additif et des informations de diagnostic puissant.

C'est dans ce contexte de combinaisons de biomarqueurs que s'inscrit notre travail qui consiste à explorer de manière aléatoire les protéines salivaires et urinaires de sujets sains et de patients atteints de maladie rénale puis de mener une caractérisation la plus exhaustive possible des différents biomarqueurs (protéines salivaires et urinaires variantes) de cette pathologie. Une telle démarche fait appel autant à des méthodologies biochimiques d'extraction et de caractérisation des protéines qu'à des calculs statistiques analysant les relations existantes entre les différents patients.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous nous intéresserons au rein et les pathologies rénales, aux liquides biologiques, salive et urines et aux biomarqueurs. Le second chapitre sera centré sur l'étude effectuée en faisant un rappel sur le matériel biologique et les différentes méthodes utilisées. Et le dernier chapitre sera consacré aux résultats et leurs interprétations, aux limites de l'étude ainsi qu'aux recommandations pour la recherche et la pratique. Enfin, une conclusion, résumant l'essentiel de cette recherche, clôture cette étude.



*Revue
bibliographique*

I. REIN ET PATHOLOGIES RENALES

1. Les reins

1.1. Situation

Les reins sont deux organes producteurs d'urine (68). Ils sont situés derrière le péritoine tapissant la cavité abdominale (rétro péritonéaux). Par rapport à la colonne vertébrale (25), ces petits organes rouge foncé en forme d'haricot(67), sont partiellement protégés par la onzième et la douzième paire de côtes (25)(Figure 1).La présence du foie fait que le rein droit est légèrement plus basse que le gauche (38).

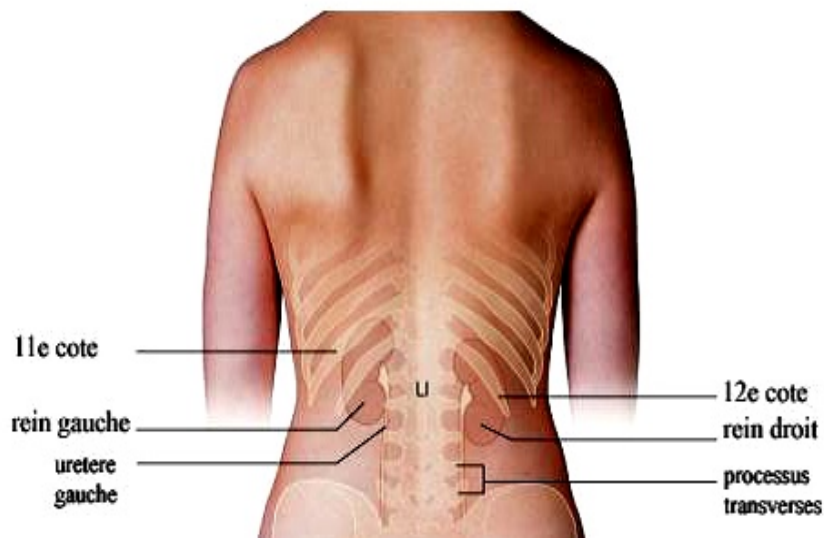


Figure 1: projection postérieure des reins (60).

1.2. Anatomie

Chaque rein a la forme d'un grain d'haricot (Figure 2), d'aspect lisse chez l'adulte et lobulé chez l'enfant (16),de couleur rouge sombre, de consistance ferme (25) avec un bord latéral convexe, et un bord médial concave, présentant à sa partie moyenne le hile du rein ; deux faces postérieure et antérieure, et deux extrémités inférieure et supérieure (50).

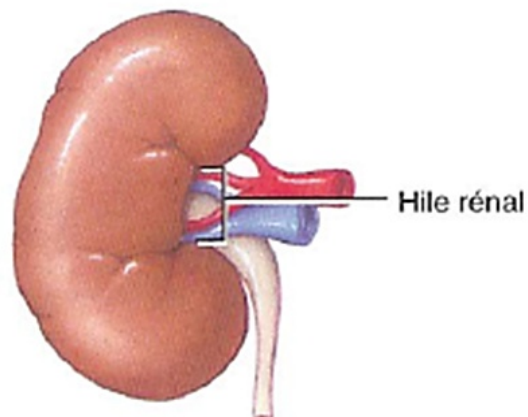


Figure 2: anatomie externe du rein (92).

Trois couches de tissus entourent le rein(27):

- Couche interne ou capsule rénale.
- La couche moyenne ou capsule adipeuse.
- La couche externe ou fascia rénale.

Le poids des reins est fonction de la surface corporelle de l'individu(74),représentant environ 4,5% de celui du corps (25). Le poids de chaque rein est de 150g pour l'homme et 130g pour la femme (68), et varie en fonction de l'âge. Le rein gauche est plus volumineux que le rein droit, il mesure 1 cm plus haut et pèse 10g de plus que le rein droit (16).

Sur une coupe frontale d'un rein, trois parties sont distinguées(67),de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 3) :

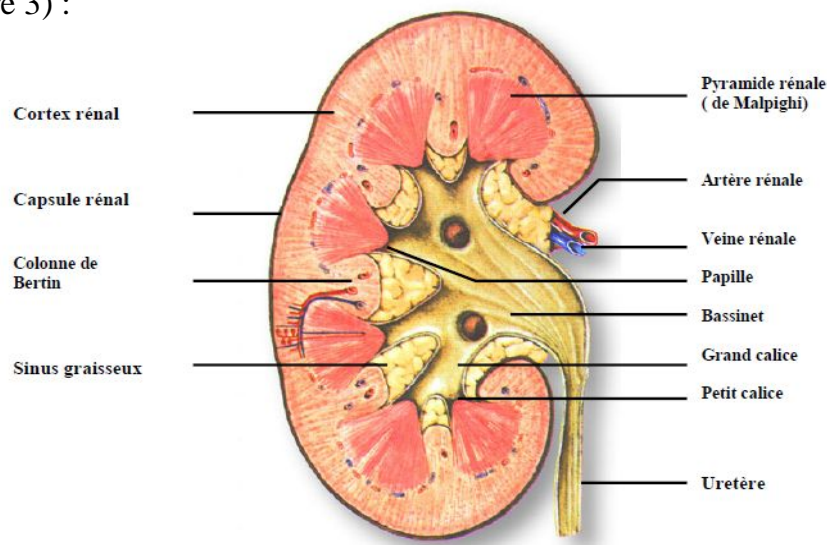


Figure 3: anatomie interne du rein (37,97).

- La capsule, membrane fibreuse périphérique, qui tapisse la face superficielle du rein (68),elle pénètre dans le sinus et recouvre les calices et les vaisseaux (11).Cette capsule est facilement clivable du parenchyme rénal (68).
- Le parenchyme rénaldivisé en deux zones : le cortex et la médullaire. La Zone corticale, plus friable,de couleur rouge jaunâtre (68),constitue une zone granuleuse qui comprend le labyrinthe et les colonnes de Bertin(71).A la périphérie du rein, elle constitue la corticale proprement dite (11). La zone médullaire decouleur rouge foncé (11), a un aspect striéet comprend des parties triangulaires à base externe appelées pyramides de Malpighi (11)aunombre de 8 à 18 par rein (71).Leur sommet forme au niveau du sinus rénal des saillies arrondies ou papilles (68).
- Le sinus qui est la cavité qui creuse la partie interne du rein. Il contient également un tissu conjonctivograisieux dans lequel se trouvent les artères et les veines rénales, ainsi que leurs branches et les lymphatiques rénaux (11).

La vascularisation rénale est assurée par les vaisseaux rénaux. Chaque rein reçoit une artère rénale venue de l'aorte abdominale qui se ramifie et repart par la veine rénale à la veine cave inférieure (2). Les reins jouent un rôle important dans l'épuration du sang ; pour cela, il est doté d'un très grand nombre d'unités fonctionnelles qui lui permettent d'assurer cette fonction. Ces unités fonctionnelles qui s'appellent les néphrons sont au nombre de 1 à 1,5 millions d'unités pour chaque rein (68). Ce nombre semble être assez variable selon les individus. Il dépend de multiples facteurs dont l'âge gestationnel, le retard de croissance intra-utérin, l'état nutritionnel maternel (97). Le nombre de néphrons étant inversement corrélé au poids de naissance (64).

1.3. Les fonctions du rein

Les reins assurent les principales fonctions du système urinaire, les autres parties sont des conduits et des lieux de stockage. Les principales fonctions du rein sont les suivantes :

- **La régulation de la composition ionique du sang**

Les reins participent à la régulation de la concentration sanguine de plusieurs ions, dont les plus importants sont les ions sodium (Na^+), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}), chlorure (Cl^-) et phosphore (HPO_4^{2-}) (90).

- **La régulation du pH sanguin**

Les reins excrètent dans l'urine des quantités variables d'ions hydrogène (H^+) et retiennent les ions bicarbonate (HCO_3^-). Ces derniers exercent un important effet tampon sur les ions H^+ présents dans le sang. Ces deux fonctions contribuent à la régulation du pH sanguin (90).

- **La régulation du volume sanguin**

En conservant ou en éliminant l'eau contenant dans l'urine, les reins ajustent le volume sanguin. Une augmentation de celui-ci provoque une élévation de la pression artérielle, alors qu'une diminution la fait baisser (90).

- **La régulation de la pression artérielle**

Les reins contribuent aussi à la régulation de la pression artérielle en sécrétant la rénine, une enzyme qui active le système rénine-angiotensine-aldostérone. Une augmentation de la sécrétion de rénine a pour effet d'élever la pression artérielle (90).

- **Le maintien de l'osmolarité sanguine**

En réglant séparément la perte d'eau et celle des solutés dans l'urine, les reins maintiennent l'osmolarité du sang à un niveau relativement stable, soit près de 300 milliosmoles par litre (mOsm / L) (90).

- **Fonction endocrine**

De nombreuses substances à activité biologique sont synthétisées dans le rein et exercent un effet systémique endocrine ou le contrôle paracrine de fonctions de transport, d'activités métaboliques, ou de la croissance des cellules rénales (41). Trois hormones sont principalement produites par le rein : (1)

- la rénine par l'appareil juxtaglomérulaire ;
- l'érythropoïétine, produite par les cellules péri-tubulaires sous l'effet de l'hypoxie ;
- les cellules tubulaires proximales assurent l'hydroxylation de la vitamine D inactive (25 H vitamine D) grâce à la 1-alpha hydroxylase en 1-25 OH vitamine D.

Autres hormones produites par le rein : L'endothéline, Kinine et kallikréine, Prostaglandines (PG), Nucléotides extracellulaires, Facteurs de croissance(86-18-23).

- **La régulation de la glycémie**

Tout comme le foie, les reins peuvent utiliser la glutamine, un acide aminé, pour la néoglucogenèse, c'est-à-dire la synthèse de nouvelles molécules de glucose. Ils libèrent ensuite le glucose dans le sang de manière à maintenir la glycémie à un taux normal (90).

- **L'excrétion des déchets et des substances étrangères**

Grâce à la formation d'urine, les reins participent à l'excrétion des déchets. Certains déchets excrétés dans l'urine proviennent de réactions métaboliques. C'est le cas d'ammoniac et de l'urée produits par la désamination des acides aminés, de la bilirubine provenant du catabolisme de l'hémoglobine, de la créatinine résultant de la dégradation de la créatine phosphate dans les myocytes et de l'acide urique issu du catabolisme des acides nucléiques. D'autres déchets excrétés dans l'urine sont des substances étrangères telles que des drogues, des médicaments et des toxines environnementales (90).

2. Principales pathologies rénales

Des maladies diverses et multiples peuvent porter préjudice au fonctionnement des reins. Les troubles apparaissent sous la forme d'une déficience des néphrons qui sont la cible de lésions irréversibles(57).

2.1. Insuffisance rénale

L'insuffisance rénale est une maladie fréquente en pratique clinique. Sa prévalence est estimée à environ 15% chez les patients hospitalisés et atteint 50% chez les patients des unités de soins intensifs. On notera en outre que 50% des patients de plus de 65 ans présentent déjà une atteinte de la fonction rénale par le simple effet de l'âge (15), et survient chez environ 1

personne sur 2000 (58). Globalement, une insuffisance rénale se caractérise par une diminution de la fonction et du nombre des néphrons (92) aussi la réduction de la capacité des reins à contrôler l'équilibre du corps en eau et en sels minéraux(100). Enfin l'insuffisance rénale, s'accompagne d'une dysrégulation cardiovasculaire, c'est-à-dire d'une mauvaise régulation, entre autres, de la pression artérielle au sein de l'organisme(100).

2.1.1. Insuffisance rénale aiguë

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est définie en termes généraux comme une diminution soudaine de la fonction rénale, suffisante pour conduire à une rétention des déchets azotés et perturber l'homéostasie hydro-électrolytique (5). Elle est moins fréquente chez l'enfant que chez l'adulte (63). Plus de 80 % des IRA en réanimation sont la conséquence de lésions tubulaires ischémiques responsables d'une nécrose tubulaire aiguë (NTA) (59) prolongée et réversible.

Le syndrome insuffisance rénale aiguë (IRA) désigne un groupe d'états dont les causes, les mécanismes et l'expression sont variés et qui ont en commun l'interruption brutale du fonctionnement des reins. Le plus souvent oligoanurie (diurèse inférieure à 400 ml/24h) et plus rarement anurie (cessation totale du débit urinaire) avec pour conséquence une rétention azotée et pour témoin une élévation rapide de l'urée et de la créatininémie (31).

On distingue 3 groupes d'insuffisance rénale aiguë selon le mécanisme physiopathologique :

- l'IRA fonctionnelle ou pré-rénale,
- l'IRA parenchymateuse ou rénale,
- l'IRA obstructive ou post-rénale (20).

2.1.2. Insuffisance rénale chronique

L'IRC est définie comme une diminution progressive des fonctions rénales objectivée par une diminution permanente du débit de filtration glomérulaire (DFG) (45), de manière irréversible évoluant depuis plus de 3 mois. Elle est en rapport avec une réduction permanente et définitive du nombre de néphrons fonctionnels (Le DFG diminue lorsque 60 à 70% des néphrons sont déjà détruits) (92), ce qui la différencie de l'insuffisance rénale aiguë (20).

L'IRC est un syndrome correspondant à une réduction des fonctions rénales. Elle est permanente (installée depuis au moins 3 mois) et irréversible.

L'IRC se caractérise par l'incapacité définitive des reins d'accomplir leur rôle d'émonctoire des déchets de l'organisme (fonction excrétrice), ainsi que leur fonction endocrine.

L'IRC est une maladie progressive, longtemps silencieuse qui peut évoluer vers un stade terminal où le rein ne peut plus assumer ni ses fonctions d'épuration, ni ses fonctions endocrines (rénine, érythropoïétine...) et qui nécessite un traitement de suppléance par dialyse ou transplantation rénale. La progression vers les stades ultimes de l'IRC est dépendante de différents paramètres d'évolution (35).

2.2. Syndrome néphrotique

Le syndrome néphrotique (SN) correspond à l'ensemble des manifestations cliniques et biologiques que provoque une protéinurie supérieure à 50 mg/kg/j(98), et une protéinurie supérieure à 3.5g/24h chez l'adulte (32), d'une hypo albuminémie inférieure à 30g/l et d'une hypo protidémie inférieure à 60 g/l (19).

Le syndrome néphrotique est une complication des maladies rénales. Sa fréquence varie selon l'âge, la race et les régions (42). Il occupe la deuxième place des pathologies rénales après les infections urinaires(8).

Le caractère pur ou impur du syndrome néphrotique doit être établi :

- Le syndrome néphrotique est qualifié de pur s'il n'est accompagné, ni d'hématurie microscopique, ni d'hypertension artérielle, ni d'insuffisance rénale organique et si la protéinurie est sélective. Un syndrome néphrotique pur traduit un syndrome hyperperméabilité capillaire glomérulaire purement fonctionnel sans anomalie visible en microscopie optique.
- Le syndrome néphrotique est qualifié d'impur s'il est associé à un ou plusieurs des signes précédents (hématurie microscopique, HTA, IRA organique). Un syndrome néphrotique impur traduit une lésion morphologique analysable en microscopie optique (42), Il peut être primitif ou secondaire(63).

L'explication physiopathologique actuelle du syndrome néphrotique semble constituer un ensemble cohérent. Un seul trouble serait à l'origine de tous les autres. Il s'agit de l'augmentation de la perméabilité glomérulaire aux protéines plasmatiques. Ceci donne une protéinurie massive qui entraînera une hypo protidémie. Cette dernière engendre à son tour deux autres troubles : hyperlipidémie et les œdèmes(52).

II. LIQUIDES BIOLOGIQUES

1. L'urine

1.1. Définition

L'urine est un fluide biologique produit par les reins en continu, stocké dans la vessie et éliminé périodiquement par l'urètre lors des mictions (24). Les propriétés physiques et la composition chimique de l'urine sont très variables et changent considérablement avec la nature et l'importance de l'apport alimentaire (53). Le volume d'urine excrété est normalement compris entre 0,5 et 2 litres par 24 heures, mais varie en fonction de l'âge du sujet, de la quantité de boissons qu'il a absorbée, de son alimentation, de son activité physique, du climat, etc. (99).

1.2. Les caractéristiques de l'urine

L'urine fraîchement émise est claire, et sa couleur jaune va de la couleur pale à l'intense. Elle est légèrement aromatique, alors que l'urine qu'on laisse reposer dégage une odeur d'ammoniac attribuable à la décomposition ou à la transformation des substances azotées par les bactéries qui contaminent l'urine à sa sortie de l'organisme. Le pH de l'urine est varié entre 4 et 8 avec une densité qui varie de 1,001 à 1,035 selon sa concentration (66).

1.3. Les composants des urines

L'urine finale est composée de 95% d'eau. L'urée, qui est formée dans le foie issu de la dégradation finale des protéines, présente une quantité de 25 mg éliminée chaque jour, c'est la substance en dilution la plus importante.

Par ailleurs, seront également éliminés en grande quantité dans les urines, l'acide urique difficilement hydrosoluble, ainsi que la créatinine qui provient du métabolisme musculaire et des viandes alimentaires. L'urine contient aussi des sels, en particulier du sel alimentaire (NaCl). Enfin, on trouve également des phosphates et des acides comme l'acide citrique ou l'acide oxalique (83).

1.4. Rôle de l'urine

L'urine joue un double rôle : élimination de déchets tels que l'urée, la créatinine et aussi un grand nombre de médicaments et de toxines, d'une part et d'autre part le maintien de la constance du milieu intérieur de l'organisme grâce à une régulation des quantités d'eau et de sels minéraux à éliminer (99).

2. La salive

2.1. Définition

Est un liquide biologique incolore, transparent, insipide, très aqueux, sécrété par les glandes salivaires, légèrement filant d'une densité 1002 à 1006. (93, 34). La salive « totale » est le fluide constitué des salives issues des glandes auxquelles viennent s'ajouter le fluide crévicaire (un exsudat du plasma provenant du plexus gingival des vaisseaux sanguins) et des constituants issus de la desquamation de l'épithélium (79).

La quantité de salive sécrétée est environ 1500 ml par jour (33), et le flux salivaire varie généralement entre 0,3 et 0,5 ml/min pour la salive au repos et entre 1 et 1,5 ml/min pour la salive stimulée (75).

2.2. Quelques caractéristiques physico-chimiques de la salive

2.2.1. Le PH

Il varie entre 5,5 et 8,5 chez l'homme en fonction de l'âge et de la localisation. La salive parotidienne est plus acide avec un pH de 5,5 au niveau de l'ostium de Sténon et le pH submandibulaire est de 6,4 (76). En absence de stimulation, le pH de la salive est légèrement inférieur à 7, mais en période de sécrétion active, il augmente à près de 8 (33).

2.2.2. La viscosité

C'est la résistance d'un fluide à l'écoulement (55), inversement proportionnelle au taux de cisaillement (26). Elle est fonction de la teneur en mucopolysaccharides dont la synthèse varie selon le type de glande. Les viscosités sont de: 1,5 poise pour les glandes parotides ; 3,4 poises pour les glandes submandibulaires ; 13,4 poises pour les glandes sublinguales (55). La viscosité (de même que la densité) varie de manière inverse au débit.

2.2.3. La pression osmotique

Initialement, la salive est isotonique, telle qu'elle est formée dans les acini. Durant son trajet dans le réseau canalaire, sa concentration en soluté change et elle devient hypotonique (48). Un milieu liquide est hypotonique par rapport à un autre lorsque sa concentration en substance dissoute est plus faible que celle du milieu de référence (ici le plasma sanguin). L'osmolarité varie en fonction du débit de sécrétion : relativement faible en situation basale (60 à 120 mosm/L), elle peut augmenter jusqu'à 300 mosm/L (76).

2.3.Composition

La salive est un mélange complexe de sécrétions produites par les glandes salivaires, de résidus alimentaires, de fluide gingival, de cellules épithéliales et de nombreux électrolytes d'origine plasmatique. Elle est constituée à 99,5% d'eau et contient 0,5% de substances dissoutes réparties en constituants organiques et inorganiques (62).

2.3.1. Constituants inorganiques

Les constituants inorganiques regroupent différents minéraux présents sous forme de sel (Tableau 1). Le cuivre, le fer et les fluorures sont à l'état de traces. La concentration de tous ces ions et électrolytes est toutefois sous la dépendance de nombreux facteurs comme le type de glande, le débit salivaire, la durée et la nature de la stimulation ou la rythmicité biologique (80).

Tableau 1: concentrations ioniques dans la salive (mmol/l sauf pour I et F) (65).

	Salive entière (fluide buccal)				Salive parotide		Salive sous-max	
	Non-stimulée		stimulée		Non-stimulé	stimulé	Non-stimulé	stimulé
	Moyen	Marge	moyen	Marge				
pH	6.0	5.7-6.2	2.3	→8	5.5	7.4	6.4	7.4
Na ⁺	8	6-26	32	13-80	1.3	36	3	45
K ⁺	21	13-40	22	13-38	24	21	14	17
Ca ⁺⁺	1.35	0.5-2.8	1.7	0.2-4.7	1.05	1.6	1.6	2.4
Mg ⁺⁺	0.3	0.1-0.6	0.4	0.2-0.6	0.15	0.12	0.07	0.4
Cl ⁻	24	8-40	25	10-56	22	28	12	25
HCO ₃ ⁻	2.9	0.1-8	20	4-40	1	30	4	18
HPO ₄ ⁻	5.5	2-22	10	2-25	9	4	6	5
I ⁻ (μmol/l)			14	2-30	0.5-2.3	0.2-1.2	1	0.5
F ⁻ (μmol/l)	1.5	0.2-2.8	5	0.8-6.3	1.5	1.0		

2.3.2. Constituants organiques

Des constituants tels que des facteurs de croissance, principalement le *nerve growth factor* (NGF) et l'*epithelial growth factor* (EGF). L'urée, l'acide urique en plus de 3 000 acides ribonucléiques (ARN) messagers ont été identifiés(6). Concernant les hormones, elles se trouvent en très petite quantité : les androgènes, l'insuline et les hormones thyroïdiennes ; le cortisol. On trouve aussi les lipides en quantité plus importante que dans le plasma, 20 à 30 mg ainsi que les glucides(17)(Tableau 2).

L'essentiel des composants organiques de la salive est représenté par plus de 1300 protéines qui ont été identifiées à ce jour par diverses approches protéomiques dont la nature et le rôle

précis de nombre d'entre elles sont encore inconnus. Il y a environ 2,5 grammes de protéines dans 1 litre de salive émise à faible débit(26), et elles sont classées en fonction de leur origine, en :

- **Protéines extrinsèques aux glandes salivaires**

Grâce à l'exsudation plasmatique par le fluide sulculaire, ces protéines se retrouvent dans la cavité buccale(17), elles sont représentées par des albumines d'origine sérique (5 % à 10 % des protéines totales), des IgA, IgG, IgM, des α et β globulines, des calprotectines ou d'autres protéines du système immunitaire (système du complément, *secretoryleukoproteaseinhibitor*(SLPI), etc. Leur concentration (20 % des protéines totales) décroît lorsque le débit salivaire augmente(49)(Tableau 2).

- **Protéines intrinsèques aux glandes salivaires**

Ce sont les protéines synthétisées par les glandes salivaires et déversées dans la salive. Le protéome salivaire comprend plus de 700 protéines qui sont classées en plusieurs familles et leur dénomination ne répond pas à des critères bien définis mais repose selon leur caractéristiques fonctionnelles (ex : enzymes), leur composition en acides aminés (proline, cystatine) ou autre (Tableau 2)(93, 55, 21).

Tableau 2: composition organique de la salive (Concentrations en mg/l sauf où indiquées) (70)

	Salive totale		Salive parotidienne		Salive sous-maxillaire	
	Moyenne	Marge	Moyenne	Marge	Moyenne	Marge
Protéines	1750		2300		1100	
-Albumine	25		2		11	
- γ -globulines	50		80		60	
-Mucoprotéines	450		800		800	
-Amylase	420		1000		300	
-Lysozyme	140		200			
-Sialoperoxidase		5-6				
-Lactoferrine		1-2		1-2		
-PRP			2000			
-Histatines			100			
-Fibronectine		2-6		2-6		2-6
Hydrates de carbone		270-400	450		300	
Glucose(mmol/l)		0.02-0.17	0.03		0.03	
Lipides	20		20		20	
Cortisol(mmol/l)		2-20				
Acides aminés	40		10		20	
Urée(mmol/l)		2.0-4.2		2.0-4.2		0.7-1.7
Ammonium (mmol/l)		0.6-7.0		0.6-7.0		0.2-7.0

2.4. Rôles de la salive

La salive, de par sa composition, assume plusieurs rôles au sein de la cavité orale. Elle lubrifie et protège les muqueuses orales, pharyngéale et œsophagienne, et également responsable de la protection de l'émail dentaire et de la régulation du pH. Elle exerce une activité antimicrobienne et intervient dans les premières phases de la digestion. Enfin, la salive joue un rôle dans la perception gustative, en intervenant, entre autres, dans la maturation des bourgeons gustatifs ou le transport de molécules rapides (Figure 4) (4)

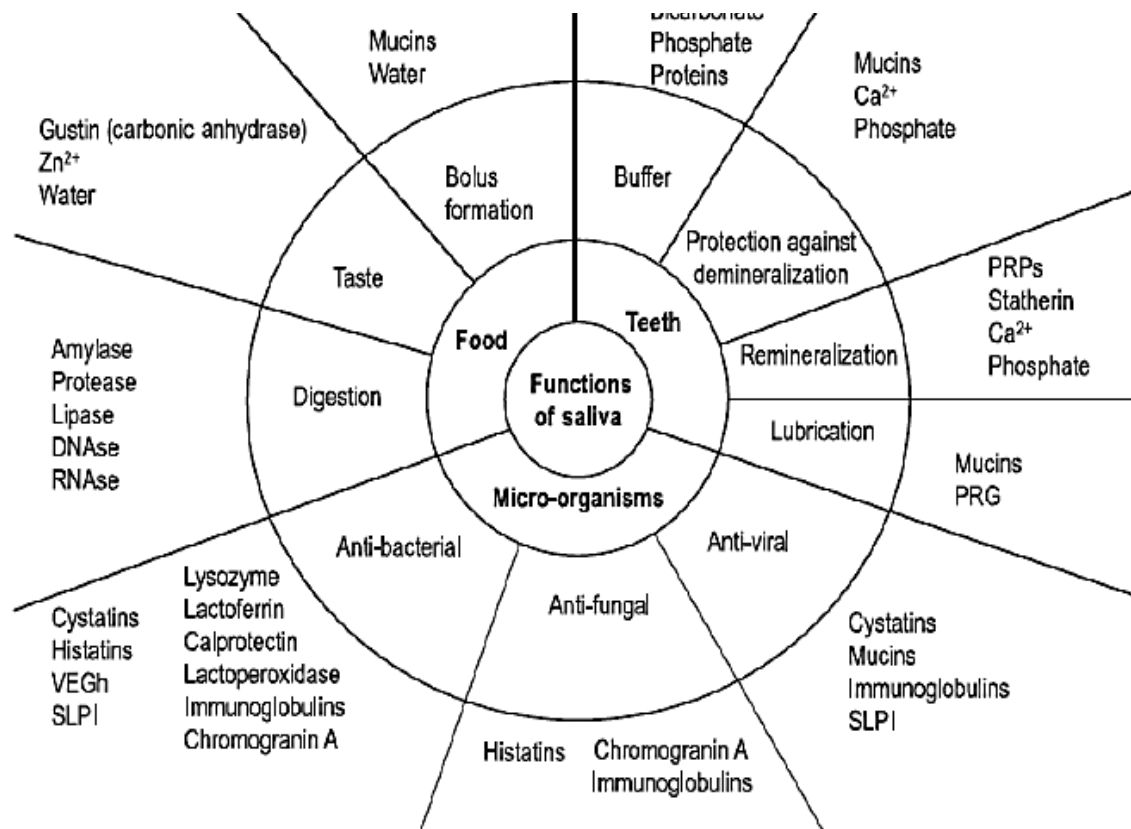


Figure 4 : rôles de la salive (4).

III. LES BIOMARQUEURS

1. Définition

En 1998, les groupes d'étude des Instituts Nationaux de Santé ont défini un biomarqueur comme « une caractéristique qui est objectivement mesurable et évaluable en tant qu'indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou des réponses pharmacologiques suite à une intervention thérapeutique »(72). Au niveau médical, un biomarqueur peut être utilisé dans le cadre d'un dépistage/diagnostic d'une pathologie comme, d'une réponse à un traitement médical, d'une rechute après un traitement et/ou d'une toxicité

de molécule. Le biomarqueur est alors, le plus souvent, une protéine dont la concentration peut être mesurée dans le sang ou une molécule détectable dans l'urine ou la salive.

2. Les biomarqueurs d'atteinte rénale

L'avancement des connaissances scientifiques dans la néphrologie a permis durant ces dernières années de mettre en évidence de nouvelles molécules susceptibles d'être utilisées comme marqueurs de l'intégrité tissulaire et de la fonction rénale. Il existe un vaste choix de biomarqueurs qui peuvent être classés selon le type d'atteinte qu'ils identifient, fonctionnelle (marqueurs de fonction) ou organique (marqueurs d'intégrité tissulaire). Ces derniers peuvent encore être subdivisés selon la structure touchée : marqueurs glomérulaires et marqueurs tubulaires(73,87)

2.1. Les biomarqueurs urinaires

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) sépare les protéines urinaires en fonction de leur poids moléculaire, et permet donc un typage de la protéinurie (glomérulaire, tubulaire, mixte ou de surcharge). En comparaison avec la migration d'un marqueur de poids moléculaire, ce gel permet de repérer les protéines d'origine tubulaire, inférieures à 67 kDa (α 2-microglobuline, lysozyme, RBP, α 1-microglobuline, monomères ou dimères de chaînes légères), l'albumine et les protéines d'origine glomérulaire supérieures à 67 kDa (transferrine, IgA, haptoglobine, IgM). Le seuil de détection est de 15 mg par bande(56, 89)(Tableau 3).

Tableau 3: principaux marqueurs des protéinuries pathologiques (56)

Protéines	MM (kDa)	Valeurs usuelles (mg/l)	Protéinuries pathologiques
β 2-microglobuline	12	< 0,5	Tubulaires (surcharges)
Lysozyme	14	< 0,5	Tubulaires (surcharges)
RBP	21	< 0,5	Tubulaires
Chaînes légères	25	< 10	Tubulaires, surcharges*
α 1-microglobuline	33	< 15	Tubulaires
Albumine	70	< 20	Glomérulaires
Transferrine	80	< 2	Glomérulaires
IgG	150	< 10	Glomérulaires (surcharges*)
α 2-macroglobuline	700	Absente	Post-rénales ?
Tamm-Horsfall	7 000	< 40	?

Hormis le déficit de réabsorption, une atteinte cellulaire au niveau du TCP peut se manifester par un relargage dans les urines de certaines protéines cellulaires. Un des axes de recherche actuelle pour l'identification de nouveaux biomarqueurs s'oriente vers ces protéines et plus particulièrement vers celles qui possèdent une activité enzymatique. Leur présence urinaire (enzymurie) résulte de la libération à partir des cellules tubulaires endommagées ou secondairement à une induction enzymatique pendant le processus de réparation ou de régénération. L'intérêt de ces marqueurs réside dans le fait qu'ils permettent la mise en évidence de dommages encore légers et réversibles. L'enzymurie permet de détecter les dommages tubulaires entre 12 heures et quatre jours plutôt que les marqueurs classiques, mais certaines pathologies glomérulaires chroniques peuvent aussi affecter ces marqueurs (30, 84). Des études ont permis d'établir la distribution des marqueurs enzymatiques le long du tubule ainsi que dans les différents compartiments cellulaires (membrane à bordure en brosse, lysosomes, cytoplasme). Ainsi, une corrélation a pu être établie entre la sévérité des dommages subis et l'origine des enzymes détectées dans l'urine en identifiant le premier site lésé (22, 95). Toutefois il est important de noter que l'évaluation de ces marqueurs présente certains désavantages tels que leur instabilité dans l'urine (qui parfois n'excède pas quatre heures) ainsi que leur inhibition par la présence d'autres substances, dont l'urée (30).

2.2. Les biomarqueurs salivaires

La salive humaine est un ultra filtrat de plasma et contient des protéines synthétisées *in situ* soit dans les glandes salivaires ou dérivés du sang et contient des marqueurs biologiques dérivés de sérum, de fluide issu de la crevasse gingivale, et transsudat muqueux. À ce jour, les chercheurs ont identifié 2340 protéines dans le protéome salivaire, dont 20-30% sont également trouvés dans le sang (9)(Tableau 4).

Cette composition protéique donne à penser que des biomolécules de détection de la sensibilité clinique et la spécificité dans la salive devrait être possible et plus facile que dans le sang (96). La salive est un bon moyen parce que sa collection est non invasive et le processus de don est relativement sans stress, de sorte que plusieurs collections peuvent être effectuées sans imposer trop de gêne sur le donateur (51). Pour identifier les protéines présentes dans la salive parotid glandulaire, Hardt et al. (44) utilisait l'électrophorèse bidimensionnelle pour séparer les protéines avant l'analyse en spectrométrie de masse. Ces méthodes ont été utilisées pour identifier des peptides dans les gammes de 1-6 KDa (histatines, cystatines, et PRP) ainsi que des protéines avec une masse moléculaire moyenne ou bien élevée (85).

Tableau 4 : liste des protéines majoritaires trouvées dans la salive humaine.(77)

Protein percentage	Structure and/or protein-family	Molecular weight, Da	Gland origin	Protein function	Reference
PRPs, 37%		15 000–18 000	Major components of parotid and submandibular salivary secretions	Mineral homeostasis; neutralization of toxic substances in the diet; protection of the underlying tissue against proteolytic attack by microorganisms	Bennick (58)
α -Amylase, 20%	Glycoprotein	62–67 000	In parotid saliva (60–120 mg/100 mL) and in submandibular saliva (\approx 25 mg/100 mL)	Breaks down starch into sugars; performs an antibacterial function in the mouth; involved in tissue lubrication	Edgar (11)
Mucins, 20%	MUC5B: an oligomeric mucin (with inter-individual variations in the degree of O-linked glycosylation) which is known to form a gel like network structure MUC7:found mainly in the soluble phase of saliva with little or no individual variations	300 000–400 000	Produced in the parotid glands	Protection of the underlying tissue against proteolytic attack by microorganisms; cytoprotection; lubrication; protection against dehydration; maintenance of viscoelasticity of saliva in secretions	Walz et al. (59)
Cystatins, 8%	Belongs to a heterogeneous family of proteins with a conserved consensus of amino acids in their active site	10 000 and 15 000	Produced in the parotid, submandibular, and sublingual glands	Antibacterial and antiviral function; regulates protein metabolism; aids in protecting tissue from proteolytic attack by microorganisms; aids mineralization	Walz et al. (59)
Human serum albumin (6%)	Globular protein, monomeric	65–66 470	Produced in the parotid, submandibular, and sublingual glands	Transporter protein; negative acute-phase protein; pH buffer	Libby et al. (33)
Soluble IgA, 3%	Globulin, antibody	\approx 160 000	Present in parotid and submandibular saliva	Immunity	Korsrud and Brandtzaeg (60)
IgG, 2%	Globulin, antibody	\approx 150 000	Present in parotid and submandibular saliva	Secondary immune response; binds a lot of pathogens and protects the body against them	Korsrud and Brandtzaeg (60)
Statherins, 1%	Phosphoproteins	12 000	Present in parotid saliva	Inhibits hydroxyapatite crystal growth; protection of underlying tissue against proteolytic attack by microorganisms; cytoprotection; lubrication; maintenance of viscoelasticity of saliva in secretions	Yao et al. (61)
Histatins, NA ^b	A family of related neutral and basic histidine-rich peptides	3 000 and 4 500	Present in all 3 types of glands	Anticandida and antimicrobial function; formation of the acquired pellicle; participation in the mineralization dynamics of oral fluids and inhibition of the release of histamine from mast cells, suggesting a role in regulation of oral inflammation	Hardt et al. (24); Yao et al. (61)

^a Scarano et al. (26), Lamkin and Oppenheim (27), and Levine (57).
^b NA, percentage not available.

Walt et al (94) et Arregger et al (7) ont signalé une série de marqueurs salivaires qui ont été associés à la maladie rénale en phase terminale. La liste des marqueurs inclus le Cortisol, le nitrite, l'acide urique, le sodium, le chlorure, le pH, l'amylase et la lactoferrine. Dans une étude ultérieure par ces enquêteurs, les bandelettes de test colorimétriques ont été utilisées pour surveiller le nitrate salivaire et l'acide urique avant et après hémodialyse (14).

Il y a peu de rapports qui emploient la salive pour dépister une maladie rénale. Cependant, certains y existent. Par exemple, les concentrations de créatinine salivaires montrent une haute sensibilité et spécificité pour déterminer la présence de maladie rénale (61).

Le rein produit l'urine principalement par diffusion passive, qui est le principal mécanisme à l'œuvre dans la formation de la salive (3). Par conséquent, les molécules quittant le sang dans les reins devraient être similaires à celles qui quittent le sang vers la glande salivaire. Grâce à des parallèles entre le sang et la salive, un test de clairance de la créatinine effectué sur la salive devrait fournir cette même information, mais plus rapidement et avec moins d'inconfort pour le patient.

3. L'intérêt des biomarqueurs

Le développement de ces nouveaux biomarqueurs d'atteinte rénale doit faciliter sa détection précoce pour améliorer la prise en charge, son diagnostic précis pour le différencier d'autres lésions, la détermination de son étiologie et du site lésé pour sélectionner la thérapie appropriée, la prédiction de sa gravité pour aider à la classification des patients à l'hôpital, à envisager le pronostic et les effets secondaires et ainsi évaluer le traitement et le suivi de la thérapie mise en place. A ce jour, un nombre limité d'études a néanmoins pu comparer l'utilisation de ces biomarqueurs en clinique afin de prédire l'issue clinique au moment du diagnostic de l'atteinte rénale (10).

Matériel

et

Méthodes

1. Matériels

1.1. Recrutement des patients

Dix-huit patients provenant du service de néphrologie de la clinique rénale Daksi Constantine, atteints de différentes maladies rénales : SN, IRC, IRA, NTA, néphropathie lupique déterminées par les symptômes cliniques et les tests de dépistage ont été étudiés. Parmi les 18 malades, 12 femmes et 6 hommes ont été recensés. Les patients sont de tranches d'âge différentes (entre 20 et 81 ans). Les patients ne présentant pas une bonne hygiène buccale ont été exclus de l'étude. Cette population a été comparée à deux sujets sains de sexe féminin âgées de 22 et 23 ans, sans pathologie connue et possédant une bonne hygiène buccale.

1.2. Recueil de la salive

Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par HIRTZ et al (47). La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. Afin de favoriser la salivation, le patient doit boire un verre d'eau 15 minutes avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de parafilm (environ 3 cm²), pendant quelques minutes. Trois ml de salive totale sont ainsi prélevés dans des tubes stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 t/min pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaires encore présents dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C).

1.3. Recueil des urines

Les urines sont prélevées au réveil ou à défaut, 3 heures minimum après la dernière miction (afin que les urines aient séjourné suffisamment de temps dans la vessie) dans des tubes stériles. Une fois prélevé, les échantillons sont immédiatement congelés (-20°C).

2. Méthodes

2.1. Extraction des protéines salivaires et urinaires

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de la salive et des urines des patients malades et des sujets sains.

2.1.1. Dans des conditions dénaturantes et réductrices

100 µl de salive et 100 µl de l'urine des patients malades et des sujets sains sont mélangés respectivement avec 100 µl et 50 µl de solution d'extraction contenant 35% (v/v) de glycérol,

22% (v/v) de Tris/HCL 1M pH 6,8, 43% (v/v) d'eau distillée, 7% (p/v) de SDS et quelques grains de bleu de bromophénol. 2,5% (v/v) de b-mercaptoethanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines salivaires. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10 000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires et urinaires dissociées et réduites sont récupérés.

2.1.2. Dans des conditions dénaturantes et non réductrices

100 µl de salive et 100µl de l'urine des patients malades et des sujets sains sont mélangés respectivement avec 100 µl et 50µl de solution d'extraction précédemment décrite sans ajout du réducteur, le b-mercaptoethanol. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont centrifugés à 10 000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires et urinaires dissociées mais non réduites sont récupérés.

2.2. Électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

Aux différentes étapes d'extraction, la composition protéique des différentes conditions est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS), avec un système vertical. L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de LAEMMLI (54) modifiée par SINGH (88) Le gel de séparation contient 12,56% de polyacrylamide et le gel d'alignement 2,88%. Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 KDa à 250 KDa. Les échantillons sont déposés à raison de 50 µl par puits pour la salive et 40µl par puits pour les urines. La migration est effectuée à 40 mA par gel dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1,4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie à 12% (p/v) de TCA et 5 % (v/v) de solution mère de Bleu de Coomassie R250 à 1 % dans l'éthanol pendant toute la nuit. Les gels sont colorés toute la nuit avec la solution de coloration. Ils en fin décolorés dans de l'eau de robinet.

2.3. Lecture des électrophorégrammes

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation et de déterminer le poids moléculaire de la bande à l'aide du marqueur de taille utilisé.

2.4. Analyse statistiques

Le traitement des données d'électrophorèse a fait appel à des méthodes statistiques, les fréquences et les indices de similarités ont été effectués à l'aide d'Excel 2010. L'établissement des dendrogrammes est réalisé à l'aide du logiciel statistica version 6.0.

Résultats

et

Discussion

I. Fractionnement des protéines salivaires et recherche de biomarqueurs

L'électrophorèse est une technique qui consiste à séparer les différentes classes de protéines. Elle permet d'observer une diminution ou une augmentation relative ou absolue de chacune de ces classes. Comme le dosage des protéines totales, elle est utilisée pour évaluer l'état général ou pour étudier différents états pathologiques. Les variations des différentes fractions de protéines permettent de mettre en évidence divers syndromes (78).

1. Analyse des profils électrophorétiques

Pour le fractionnement des protéines salivaires, la technique d'électrophorèse utilisée est celle décrite par (54) et modifiée par (88). C'est une technique qui permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes nous permet de révéler la mobilité de chacune de ces bandes protéiques réparties dans les deux zones de protéines de haut et de faible poids moléculaire (HPM et FPM), en mesurant la distance parcourue par chaque protéine dans le gel de séparation.

1.1. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE

Les diagrammes électrophorétiques des échantillons analysés renferment de 5 à 18 bandes protéiques décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires avec des mobilités variant entre 28 et 138 mm (Figure 5).

Nous avons dénombré 24 bandes protéiques de mobilités différentes : 10 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines salivaires HPM et 14 bandes dans la zone 2 des protéines salivaires FPM, caractérisées par des gammes de masses moléculaires approximatives de 250-50 KDa et de 50-10 KDa respectivement.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et des sujets sains révèle des variations dans la composition protéique dans les deux zones des protéines salivaires HPM et FPM. Cinq bandes protéiques nommées D1, D2, D3, D4 et D5 sont les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces dernières est représentée dans le (tableau 5).

Nous constatons clairement des différences entre les sujets sains et les sujets malades dans la composition protéique où la bande D1 variable qualitativement est présente presque uniquement chez les sujets sains et la bande D2 variable quantitativement est présente également dans le profil des sujets sains avec une intensité plus élevée par rapport aux sujets

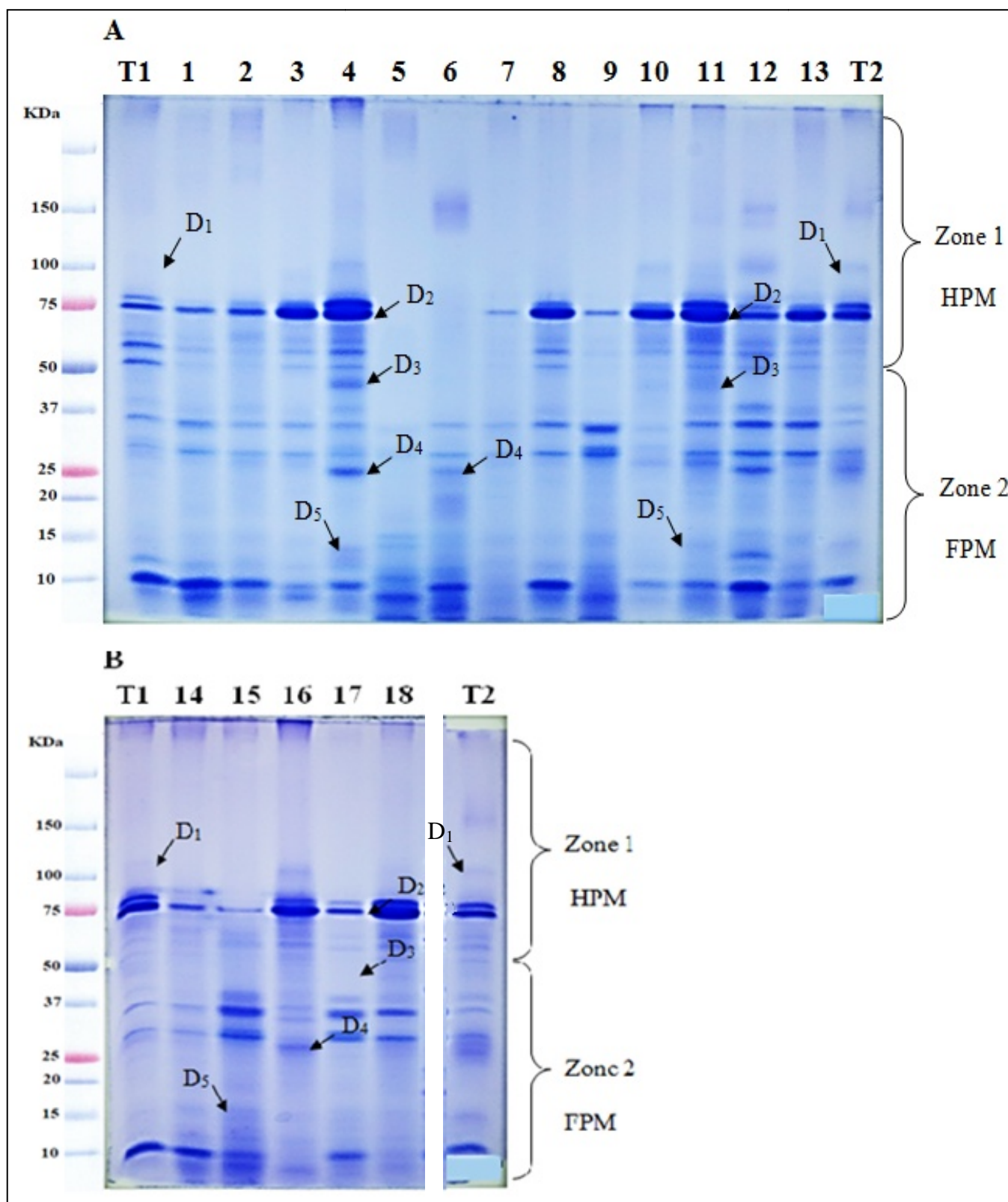


Figure 5 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. A : T1, T2 : Témoin. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 : patients malades. B : T1, T2 : Témoin. 14, 15, 16, 17, 18 : patients malades.

malades 6 et 7 et avec une faible intensité par rapport aux sujets malades 4 et 11. Les bandes D3, D4 et D5 sont variables qualitativement et quantitativement où elles sont absentes chez les sujets sains, ce qui n'est pas le cas pour les malades, ainsi leurs intensité varie entre les malades eux-mêmes (Tableau 5).

Tableau 5 : variation des bandes protéiques D1, D2, D3, D4, D5

	D1/Intensité	D2/Intensité	D3/Intensité	D4/Intensité	D5/Intensité
Témoins	P (traces)	P (++)	A(0)	A(0)	A(0)
E4	P (traces)	P (+++)	P(+)	P (++)	P (traces)
E6	A(0)	A(0)	P (traces)	P(+)	P (traces)
E7	A(0)	P(+)	A(0)	A(0)	A(0)
E11	A(0)	P (+++)	P(+)	A(0)	P (traces)

P : présence

A : absence

E : échantillon

Etant donné, que la bande protéique D1 n'existe presque que chez les témoins, nous pouvons la suggérer comme un biomarqueur de la maladie rénale. D'après (39), une protéine qui existe chez un sujet sain et absente chez les sujets malades, peut être considérée comme un biomarqueur de la pathologie.

Nous avons observé également des différences dans la composition protéique salivaire entre les malades. Ainsi, la bande D2 présente chez les patients 4 et 11 avec une même intensité et chez le patient 7 avec une faible intensité, est absente chez le patient 6. Alors que la bande D3 qui existe chez les patients 4, 6 et 11 est absente chez le patient 7. La bande D4 existe chez les patients 4, 6 et elle est absente chez les patients 7 et 11. Finalement la bande D5 présente chez le 4, 6, 11 est absente chez le patient 7.

1.2. Analyse des protéines salivaires dénaturées et non réduites fractionnées par SDS-PAGE

Les diagrammes électrophorétiques des échantillons analysés renferment de 8 à 21 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires de haut et de faible poids moléculaire avec des mobilités allant de 1 jusqu'à 134 mm (Figure 6).

Nous avons identifiés 30 bandes protéiques réparties comme suit : 16 bandes protéiques dans la zone 1 de protéines salivaires HPM caractérisée par la gamme de masse moléculaires

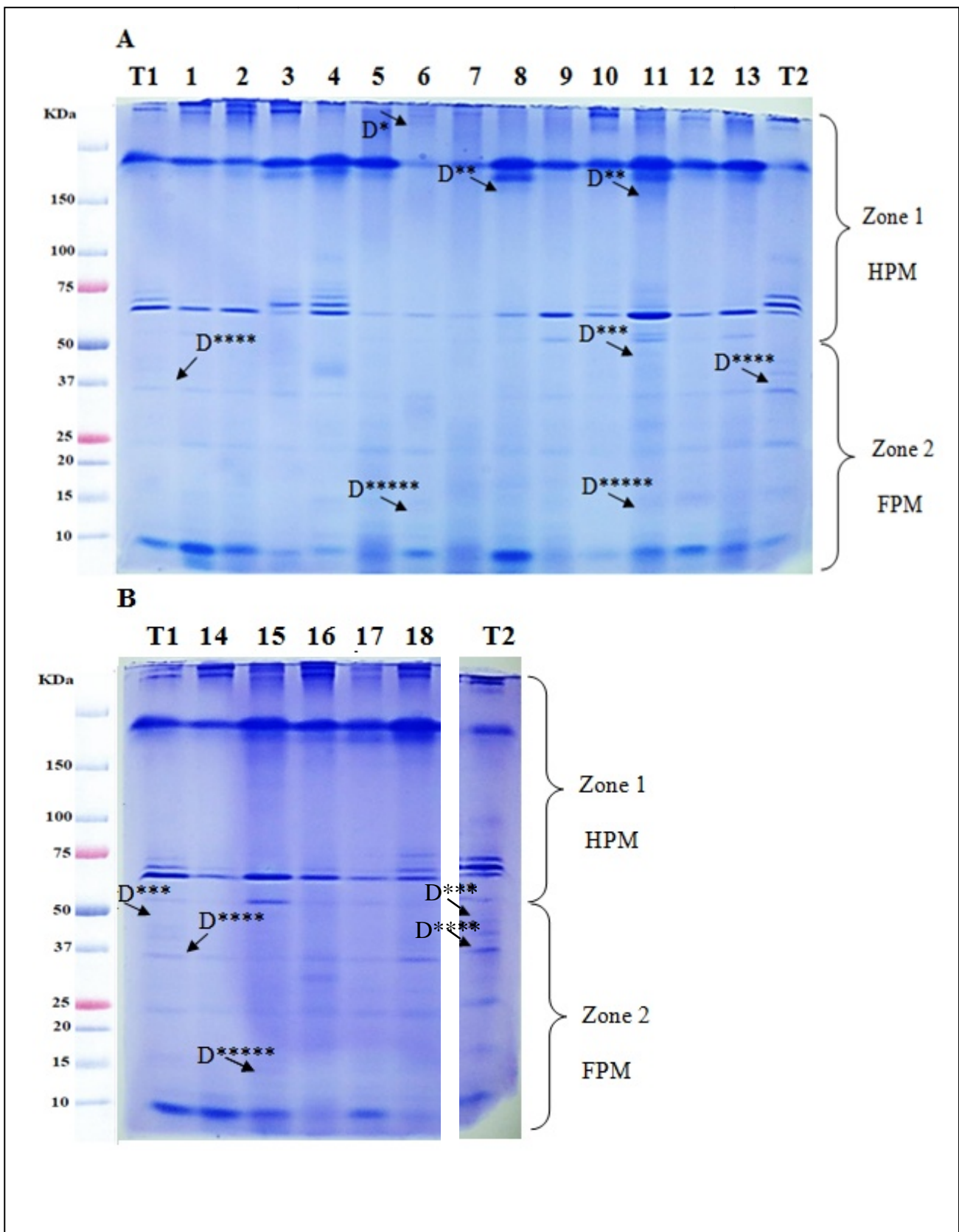


Figure 6 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE. A : T1, T2 : Témoin. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 : patients malades. B : T1, T2 : Témoin. 14, 15, 16, 17, 18 : patients malades.

approximatives de 250-50 KDa et 14 bandes protéiques dans la zone 2 de protéines salivaires FPM caractérisée par la gamme de masse moléculaires approximatives de 50-10 KDa.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et des sujets sains révèle des variations dans la composition protéique salivaire où les différences résident dans les deux zones contenant les bandes D*, D**, D***, D****, D***** (Figure 6) représentant les bandes les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces bandes protéiques est représentée dans le tableau 6.

Tableau 6 : variation des bandes protéiques D*, D, D***, D****, D*******

	D*/Intensité	D**/Intensité	D***/Intensité	D****/Intensité	D*****/Intensité
Témoins	A(0)	P(+)	A(0)	P (traces)	A(0)
E6	P(+)	P(+)	A(0)	A(0)	P (traces)
E8	A(0)	P(+)	A(0)	A(0)	A(0)
E11	A(0)	P (++)	P(+)	A(0)	P (traces)
E15	A(0)	P (++)	A(0)	A(0)	P (traces)

P : présence A : absence E : échantillon

Des différences sont constatées entre les sujets sains et les patients malades dans la composition protéique où la bande D**** est observée seulement chez les témoins.

D'après (81), les caractéristiques biologiques identifiées uniquement dans l'échantillon du patient par mesures répétées ou différenciellement par rapport à un témoin peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs de l'état physiologique correspondant.

Par contre la bande D* existe seulement chez le patient 6, la bande D *** existe uniquement chez le patient 11 et la bande D***** existe chez les patients 6, 11, 15 à l'état de trace .Ces trois bandes sont absentes chez les témoins, alors que la bande D** existe aussi bien chez les patients que les témoins mais elle est plus intense chez les patients 11 et 15.

2. Etude de la variabilité des protéines salivaires

2.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites

2.1.1. Etude des protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 20 échantillons a permis de distinguer 10 types de protéines salivaires de haut poids moléculaire (Tableau 7).

Dans cette zone de haut poids moléculaire (Figure 5), la variabilité des bandes protéiques est peu importante. La bande protéique 7 de mobilité 58 mm dispose de la fréquence la plus

importante qui est de 90% et est présente chez 18 échantillons. Elle constitue la protéine salivaire dominante de la zone 1, suivie par les bandes 8 de mobilité 66 mm, 9 de mobilité 69 mm et 10 de mobilité 73 mm retrouvées dans 17 échantillons, ensuite vient la bande 6 de mobilité 55 mm repérée dans 14 échantillons.

Enfin les bandes protéiques les moins fréquentes sont 5, 3, 1, 2, 4 de mobilités 52, 44, 28, 32, 46 mm. Chacune est présente dans 9, 7, 3 et 2 échantillons respectivement (Tableau 7).

Tableau 7 : variabilité des protéines salivaires de HPM

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
B1	28	E6, E12, T2	15
B2	32	E11, E12	10
B3	44	T1, E4, E10, E11, E12, E16, T2	35
B4	46	E3, E11	10
B5	52	T1, E4, E8, E11, E12, E13, E14, E16, T2	45
B6	55	T1, E1, E2, E3, E4, E8, E10, E11, E12, E13, E16, E17, E18, T2	70
B7	58	T1, E1, E2, E3, E4, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	90
B8	66	T1, E1, E2, E3, E4, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	85
B9	69	T1, E1, E2, E3, E4, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	85
B10	73	T1, E1, E2, E3, E4, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	85

2.1.2. Étude des protéines salivaires de FPM

L'analyse électrophorétique des 20 échantillons a permis de distinguer 14 types de protéines salivaires de faible poids moléculaire dans les conditions dénaturantes et réductrices (Figure 5).

La bande 13 de mobilité 90 mm dispose de la fréquence la plus élevée qui est de 100% et est considérée comme étant la protéine salivaire dominante dans cette zone de faible poids moléculaire. Elle est suivie par les bandes protéiques 16, 24 de mobilités 97, 138 mm successivement localisées dans 17 échantillons avec une fréquence de 85%. Par la suite apparaît la bande 23 de mobilité 134mm et de fréquence 80% répertoriée chez 16 échantillons, suivie par les bandes protéiques 12, 17 de mobilités 85, 99 mm successivement retrouvées dans 14 échantillons avec une fréquence de 70%. La bande 20 de mobilité 122 mm

est de fréquence moyenne de 55% est répertoriée chez 11 échantillons, suivie par les bandes 21,15, 18, 19, 11, 14, 22 de mobilités différentes 129, 96,102, 109, 78, 94, 132 mm respectivement avec des fréquences variant de 50% à 5% retrouvées chez un nombre de patients variant entre 10 et 1 (Tableau 8).

Tableau 8 : variabilité des protéines salivaires de FPM

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
B11	78	E4, E10, E11	15
B12	85	T1, E1, E2, E3, E4, E8, E11, E12, E13, E15, E16, E17, E18, T2	70
B13	90	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	100
B14	94	E16	5
B15	96	T1, E1, E4, E9, E10, E15, E17	35
B16	97	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E17, T2	85
B17	99	T1, E1, E2, E3, E7, E8, E10, E11, E13, E14, E15, E17, E18, T2	70
B18	102	E4, E6, E12, E16, T2	25
B19	109	E6, E11, E12, E13	20
B20	122	E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E13, E14, E15, T2	55
B21	129	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E14, E15, E16	50
B22	132	E5	5
B23	134	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E8, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E17, T2	80
B24	138	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, T2	85

2.2.Étude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et non réduites

2.2.1. Étude des protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 20 échantillons a permis de distinguer 16 types de protéines salivaires de haut poids moléculaire dans les conditions dénaturantes et non réductrices.

Une fréquence de 100% est observée chez les échantillons et concerne les bandes 4, 12 de mobilités 19, 64 mm, suivie de la bande 2 de mobilité 4 mm présente chez 18 échantillons avec une fréquences de 90%, ensuite vient la bande 15, de mobilité 70 mm présente chez 17 échantillons avec une fréquences de 85 %. La plus faible fréquence est de 5% pour les bandes

6, 13, 14 de mobilités 26, 65, 67 mm qui sont présente chez un seul échantillon seulement (Tableau 9).

Tableau 9 : variabilité des protéines salivaires de HPM

Bandes	Mobilités (mm)	Échantillons	Fréquences %
B1	1	T1, E1, E2, E3, E4, E6, E14, E15, E16, E17, E18, T2	60
B2	4	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E1, T2	90
B3	6	E6, E10	10
B4	19	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	100
B5	24	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E8, E10, E11, E12, E13, E15, E16, E17, E18, T2	80
B6	26	E8	5
B7	46	E4, T2	10
B8	55	T1, E4, E10, E11, E17, E18, T2	35
B9	57	T1, E3, E4, E10, E11, E13, E14, E16, E18, T2	50
B10	59	T1, E3, E4, E10, E11, E16, E18, T2	40
B11	61	T1, E3, E4, E10, E11, E12, E13, E14, E16, E17, E18, T2	60
B12	64	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	100
B13	65	E11	5
B14	67	E11	5
B15	70	T1, E1, E2, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	85
B16	72	T1, E2, E9, E11, E13, T2	30

2.2.2. Étude des protéines salivaires de FPM

L'analyse électrophorétique des 20 échantillons a permis de distinguer 14 types de protéines salivaires de faible poids moléculaire dans les conditions dénaturantes et non réductrices.

La bande 30 est la plus fréquente de mobilité 134 mm présente chez tous les échantillons avec une fréquence de 100%, puis vient la bande 23 de mobilité 104 mm avec une fréquence de 95% retrouvée chez 19 échantillons, ensuite apparait la bande 20 avec une fréquence de 90% présente dans 18 échantillons avec une mobilité de 87 mm. Par la suite vient la bande 29 de mobilité 127 mm avec une fréquence de 80% retrouvée chez 16 échantillons, ensuite apparait la bande 26 avec une fréquence de 65% présente dans 13 échantillons avec une mobilité de 117 mm. Les bandes 19, 24, 25 de mobilités respectives 84, 108, 112 mm sont les moins fréquentes avec un pourcentage de 10% (Tableau 10).

Tableau 10 : variabilité des protéines salivaires de FPM

Bandes	Mobilités (mm)	Échantillons	Fréquences %
B17	78	T1, E3, E9, E11, E13	25
B18	81	T1, E4, E10, E11, E12, E18, T2	35
B19	84	T1, T2	10
B20	87	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	90
B21	96	T1, E1, E2, E4, E5, E6, E8, E9, E11, E13, E16, T2	60
B22	99	E4, E5, E7	15
B23	104	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	95
B24	108	E2, E4	10
B25	112	E8, E9	10
B26	117	T1, E1, E2, E4, E5, E6, E9, E11, E12, E15, E16, E17, T2	65
B27	120	E4, E5, E6, E11, E12, E15, E16, E17	40
B28	125	E1, E2, E5, E6, E12	25
B29	127	T1, E1, E2, E4, E5, E6, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E17, E18, T2	80
B30	134	T1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, T2	100

3. Classification hiérarchique des protéines salivaires

Le dendrogramme ou représentation sous forme d'arbre hiérarchique est réalisé à partir des comparaisons de la composition protéique des différents échantillons.

Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemble des éléments qui sont plus ou moins proche entre eux, plus nous avançons dans le regroupement plus nous nous rapprochons du sommet de l'arbre. Cette représentation matérialise bien le fait que les classes formées au cours du processus de classification constituent une hiérarchie indiquée de classe partiellement emboîtées les unes dans les autres.

3.1. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation nous montre de nombreux groupes permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons (Figure 7).

L'ensemble des échantillons est scindé en deux principaux groupes à la distance d'agrégation 3,2. En effet, le premier groupe est polymorphe contrairement au deuxième groupe qui est divisé à son tour en deux sous-groupes dont le premier sous-groupe est composé de deux

patients formant un clade avec des niveaux de similarités élevés (patients 5 et 6), alors que le deuxième sous-groupe est composé aussi de deux patients formant un clade (patients 7 et 9) (Figure 7).

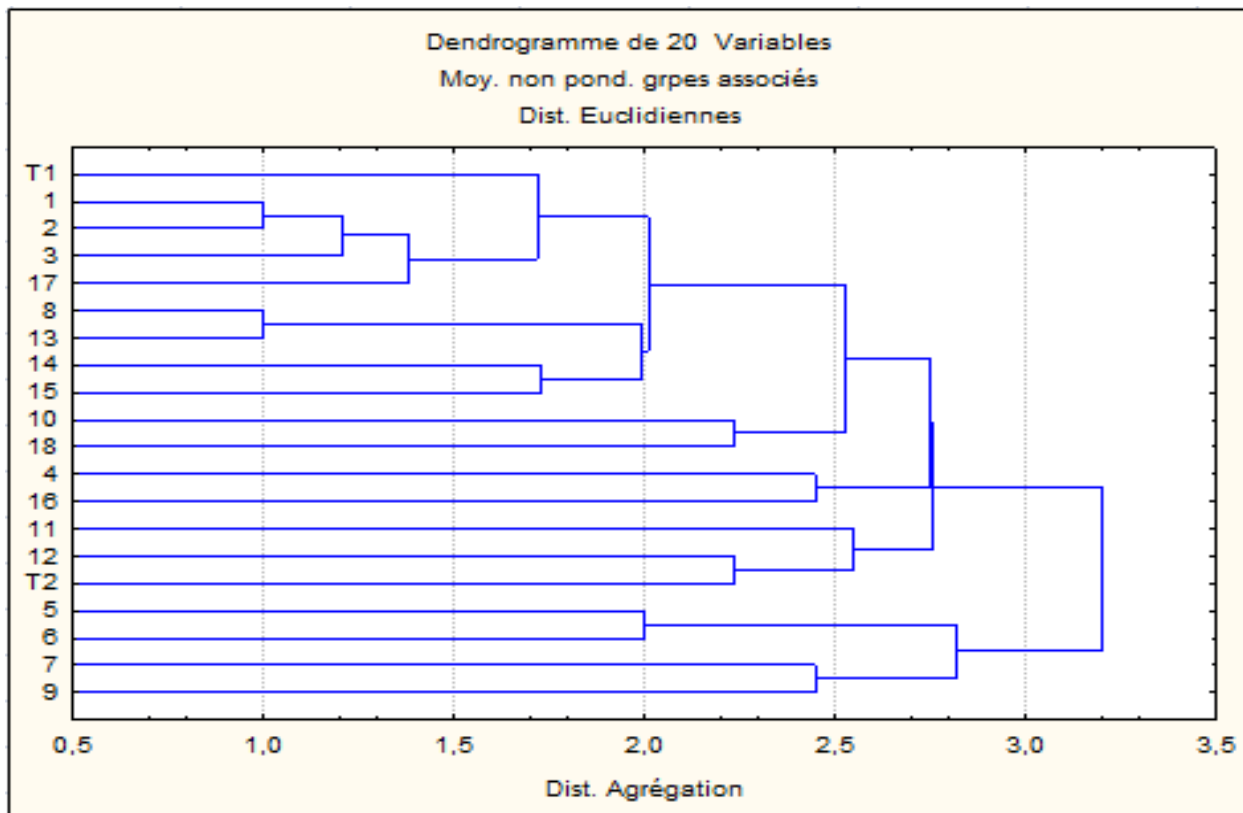


Figure 7 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices

Concernant le premier groupe, il se subdivise en trois sous-groupes où le premier reste polymorphe et renferme un grand nombre d'échantillons alors que le second sous-groupe est composé de deux patients formant un clade avec des niveaux de similarités élevés (patients 4 et 16). Le troisième sous-groupe lui-même fractionné en deux dont le premier sous-groupe contient le patient 11 uniquement et le second est composé de deux patients formant un clade avec des niveaux de similarités élevés (patient 12 avec le T2 qui est un témoin).

Concernant le premier sous-groupe très polymorphe et renfermant un grand nombre d'échantillons à distance d'agrégation égale à 2,5, il se fractionne en deux autres groupes où il forme dans la deuxième fraction un clade entre les patients (10 et 18) tandis que la première fraction donne encore deux autres subdivisions à la distance 2,0 dont la deuxième subdivision contient deux branches formant un clade chacune à la distance 1,7 (les patients 14 et 15) et 1,0

(les patients 8 et 13) respectivement. Concernant la première subdivision elle montre plusieurs divisions qui constituent des groupes à part à la distance 1,7 (témoin), 1,4 (l'échantillon 17) et 1,2 (l'échantillon 3).

A la distance 2,0 qui correspond à la valeur moyenne des distances d'agrégation (Figure 8), le dendrogramme révèle un degré de similitude de la composition en protéines salivaires de quelques échantillons.

Les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires et l'état physiologique et pathologique des patients ne sont pas corrélés, autrement dit certains patients appartiennent au même groupe malgré les différences qui subsistent entre eux.

Par exemple : les patients 8 et 13 appartiennent au même groupe en formant un clade, malgré que le patient 8 est un homme hypertendu âgé de 32 ans dont la maladie remonte à 1 ans atteint d'un syndrome néphrotique sur insuffisance rénale aigue alors que la patiente 13 une femme âgée de 30 ans n'est qu'au début de sa maladie diagnostiquée par une insuffisance rénale aigue.

Un autre exemple avec les patients 14 et 15. Le patient 14 est un homme qui n'est qu'au début d'un syndrome néphrotique impur âgé seulement de 45 ans contrairement au patiente 15 une femme âgée de 81 ans qui a une insuffisance rénale chronique.

Un autre cas regroupe les patients 7 et 9. Le patient 7 est un homme âgé de 20 ans, atteint d'un syndrome néphrotique impur depuis 6 mois contrairement à la patiente 9, une femme âgée de 40 ans dont le diagnostic montre une nécrose tubulaire aigue après accouchement.

Concernant le cas où le patient 12 et le témoin T2 formant un clade ensemble, ceci pourrait être expliqué par la progression lente de la maladie de la patiente 12, une femme âgée de 28 ans atteinte de néphropathie lupique sur GEM stade 2 qui ne se traduit pas par des changements dans la composition protéique salivaire qui est proche de la composition protéique salivaire du témoin. La GEM est notamment caractérisée par la présence de dépôts immuns au niveau de la membrane basale glomérulaire. 10 à 15% des patients parviennent au stade d'IRT après 10 à 15 ans d'évolution (43).

D'après ces résultats, nous pouvons dire que l'âge, le sexe, le stade et le type de la maladie peuvent avoir des répercussions sur la composition protéique des patients. Walt et al (94) et Arregger et al (7) ont signalé une série de marqueurs salivaires qui ont été associés à la maladie rénale en phase terminale (14). D'autre part on remarque que l'activité de l'amylase est réduite chez les personnes âgées (12).

3.2. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et non réduites

L'ensemble des échantillons est scindé en deux groupes principaux à la distance d'agrégation 3,4. En effet, le premier groupe est polymorphe contrairement au second groupe incluant l'échantillon 10 qui constitue un groupe à part. Ce patient est un homme âgé de 49 ans, diabétique et hypertendu, avec une cholestérolémie élevée et la thyroïde en plus d'une insuffisance rénale chronique à un stade terminal.

La figure 8 nous montre deux grands sous-groupes dans le premier groupe présentant plusieurs subdivisions dont la première est à la distance d'agrégation 2,7 incluant l'échantillon 4 qui constitue un groupe à part, la deuxième est à la distance 2,4 incluant l'échantillon 11 qui constitue aussi un groupe à part en plus d'un un clade composé par les deux témoins (T1 et T2) présentant entre eux des niveaux de similarités élevés et sont très différents des patients présentant une maladie rénale. Cependant, le second sous-groupe englobe le reste des patients.

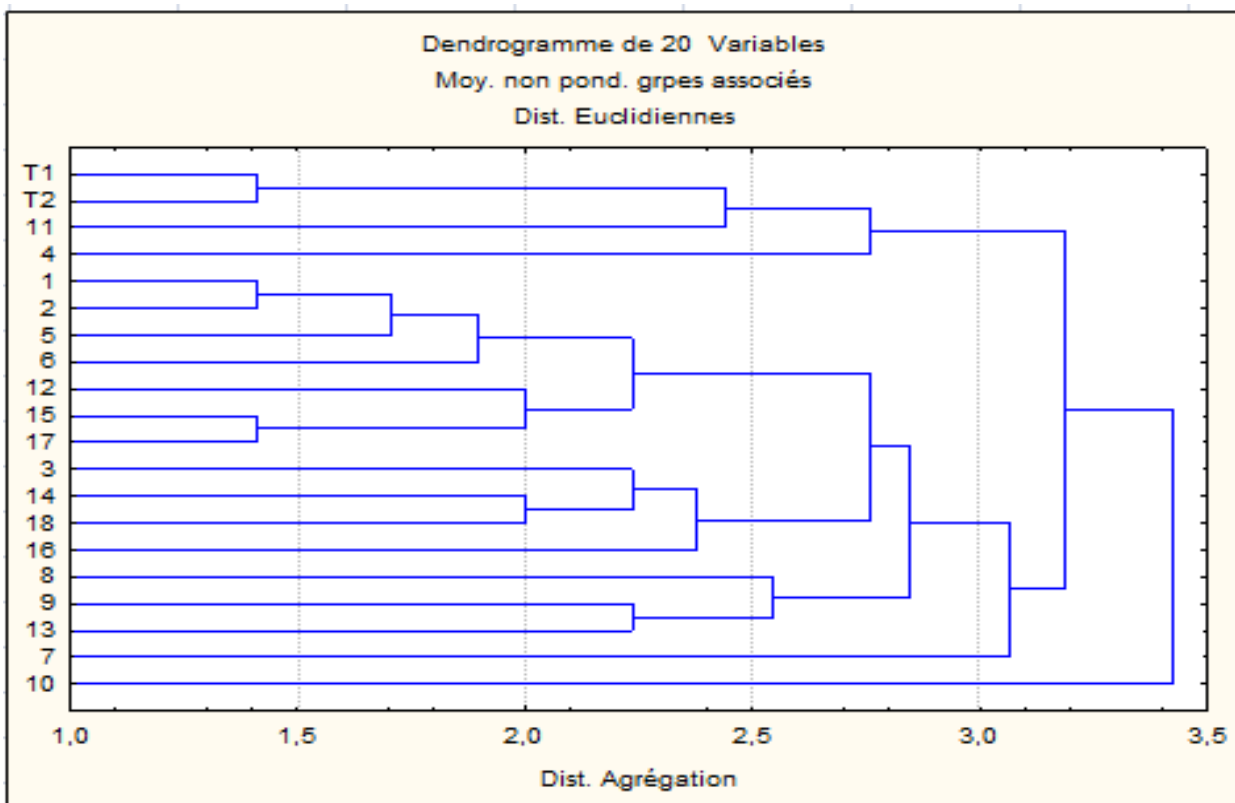


Figure 8 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices.

La valeur moyenne des distances d'agrégation est de 2,25 (Figure 8), à cette distance le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la composition en protéines salivaires de presque tous les échantillons.

L'état physiologique et pathologique des patients et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires ne sont pas corrélés, autrement dit certains patients appartiennent au même groupe malgré les différences qui subsistent entre eux.

Par exemple : les patients 1 et 2 formant un clade et appartenant au même groupe malgré les différences présentes dans leurs caractéristiques cliniques. Le patient 1 est un homme âgé de 40 ans dont la date de dépistage remonte à 3 ans avec une échographie montrant une taille augmenté de plus de 11cm de grand axe de leurs reins et est atteint d'un syndrome néphrotique impur avec un père diabétique alors que le patient 2 est un homme hypertendue âgé de 27 ans dont la date de dépistage remonte à 23 ans atteint d'un syndrome néphrotique, avec une échographie montrant un seul rein de taille normale (l'autre rein est amputé) et présente des symptômes de la thyroïde.

Les patients 15 et 17 formant aussi un clade, malgré que la patiente 15, une femme âgée de 81 ans atteinte d'une insuffisance rénale chronique avec une échographie montrant une taille diminuée des reins et présente des symptômes de la thyroïde tandis que la patiente 17 qui est une femme âgée de 59 ans atteinte d'un syndrome néphrotique avec des reins de taille augmenté et présente des symptômes de la thyroïde.

Les patients 14 et 18 formant un clade, malgré que le patient 14 est un homme âgé de 45 ans dont le diagnostic a montré une atteinte rénale depuis 15 jours par un syndrome néphrotique impur causé par un surdosage médicamenteux sachant que cette personne est alcoolique bien que la taille de leurs reins est normale. Néanmoins la patiente 18 qui est une femme hypertendue âgée de 64 ans dont la date de dépistage remonte à 4 ans est atteinte d'une insuffisance rénale aigue sur insuffisance rénale chronique avec des reins de taille diminuée.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que les facteurs ayant une influence sur la composition salivaire chez les malades sont les antécédents personnels. L'abus chronique d'alcool est lié à des changements importants dans la sécrétion et la composition salivaire, en particulier, une importante baisse des protéines totales et de la sécrétion d'amylase (29). Pour la salive au repos ainsi que la salive stimulée, la concentration totale de protéines ainsi que l'activité de l'amylase sont abaissées sous traitement actif (69). Il existe aussi des facteurs chirurgicaux, familiaux tels que le diabète, il semblerait par ailleurs que l'activité de

l'amylase salivaire puisse être élevée chez les patients diabétiques dont la glycémie est haute (28).

Le fluide physiologique associé au rein est la salive épaisse, il existe deux types de salive : la salive épaisse en relation avec le système fonctionnel du rein d'une part et d'autre part la salive fluide en relation avec le système fonctionnel de la rate. La salive épaisse a pour fonction d'humidifier et de ramollir les aliments afin d'en faciliter l'ingestion de nettoyer et de protéger la cavité buccale et aussi de nourrir l'essence du rein. La salive épaisse est produite à partie de l'essence du rein (82).

Plus de la moitié des patients hémodialysés se plaignent d'hypo salivation, d'halitose, d'altération du goût et de douleurs de la muqueuse buccale.

4. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons

L'indice de similarité ou indice de ressemblance (IRS) a été calculé en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des échantillons comparés. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes des autres c'est-à-dire qu'ils ont la même mobilité.

$$\text{IRS} = \text{IRA} / \text{N} \times 100$$

Les valeurs de l'IRS sont rassemblées dans les tableaux 11 et 12.

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins.

La plupart des échantillons restent différenciable car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

4.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites

Les indices de similarités ont été effectués pour les 18 échantillons ayant une maladie rénale. Ils sont représentés sous forme de matrice dans le tableau 11. Il en ressort que l'indice se situe entre 6 et 93%.

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances comme le cas du patient 6 avec le 18 (IRS= 6%) ainsi que le patient 5 avec le 18 (IRS= 7%).

Inversement, lorsque les valeurs de l'indice sont élevées, les diagrammes apparaissent voisins tels que les patients 8 et 13 présentant un indice de similarité maximal qui est de 93%, suivie de l'IRS= 92% observé chez les patients 1 et 2 et, 1 et 17, 2 et 3. Une valeur moyenne de 50%

est aussi observée entre certains patients, comme les patients 2 et 9, 3 et 10, 8 et 10, 10 et 15, 13 et 16, 15 et 18, 16 et 18.

Tableau 11 : Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
100	92	86	67	33	29	29	73	57	60	55	53	69	67	86	56	92	62	1
	100	92	61	36	31	31	79	50	53	58	56	73	77	79	56	85	67	2
		100	58	33	29	29	73	47	50	63	53	69	67	73	53	79	62	3
			100	33	37	22	67	53	56	67	65	63	67	67	67	61	39	4
				100	60	33	33	33	13	25	21	31	46	43	18	27	7	5
					100	27	29	29	11	29	39	35	40	38	22	24	6	6
						100	38	40	23	28	17	36	42	38	13	31	30	7
							100	57	50	72	61	93	79	73	53	79	62	8
								100	43	42	39	53	62	69	38	62	42	9
									100	53	42	47	44	50	41	64	58	10
										100	70	78	58	55	48	58	44	11
											100	67	47	45	61	56	41	12
												100	73	69	50	73	57	13
													100	79	47	60	43	14
														100	44	79	50	15
															100	47	50	16
																100	67	17
																	100	18

4.2. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites

Le calcul des indices de similarité des 18 échantillons montre que les valeurs de l'IRS varient entre 16 et 87% (Tableau 12). Les valeurs d'IRS les plus élevées pour cette condition sont de 86 et 87%. Ces dernières sont présentes entre les patients 15 et 17, 1 et 2, respectivement. Une valeur moyenne de 50% est aussi observée entre certains patients, comme les patients 2 et 11, 2 et 18, 3 et 11, 3 et 15, 4 et 12, 11 et 15. Des valeurs moins élevées, sont aussi présentes et concernent les patients 8 et 10, 9 et 10 avec les valeurs 22 et 16 % respectivement.

A la lumière de tous ces calculs d'indices de similarité, nous concluons que quel que soit la condition utilisée, il existe une similitude élevée entre certains patients présentant naturellement une ressemblance dans leur composition protéique et leur état physiologique et /ou pathologique. A l'inverse d'autres patients ayant une origine physiologique et /ou pathologique éloignés montrent des IRS faibles. Cette comparaison des profils des protéines totales obtenus par électrophorèse en présence de SDS peut être fiable pour grouper un certain nombre de patients.

Tableau 12 : Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
100	87	47	50	80	80	40	60	60	26	48	69	59	60	79	65	69	56	1
	100	42	52	71	71	35	53	63	25	50	61	61	53	69	58	61	50	2
		100	52	37	37	33	35	35	53	50	44	63	64	50	69	53	69	3
			100	55	48	27	35	35	48	64	50	48	48	52	67	62	67	4
				100	75	47	56	56	25	52	75	56	47	73	61	65	45	5
					100	38	47	56	25	46	65	47	56	73	61	65	45	6
						100	46	36	27	26	38	38	46	43	35	38	35	7
							100	57	22	39	47	56	47	53	44	47	44	8
								100	16	52	47	67	47	53	44	47	37	9
									100	45	39	39	38	28	44	39	63	10
										100	59	67	45	50	64	59	64	11
											100	56	56	73	61	75	56	12
												100	67	53	61	56	61	13
													100	64	63	67	73	14
														100	69	86	59	15
															100	71	67	16
																100	71	17
																	100	18

5. Conséquence des différentes atteintes rénales sur le protéome salivaire

L'analyse comparative des profils électrophorétiques des protéines salivaires extraites dans deux conditions différentes : dénaturantes réductrices, dénaturantes non réductrices montre qu'environ 5 bandes protéiques communes entre les différents échantillons, nommées D1, D2, D3, D4 et D5 (figure 15), D*, D**, D***, D**** et D***** (figure 16), présentent une variation d'expression qualitative et quantitative et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente par rapport à celles obtenus sur le profil du témoin.

Deux exemples de protéines exprimées que chez les témoins et absentes relativement chez les patients atteints d'une maladie rénale ; la D1 révélée dans les conditions dénaturantes et réductrices et la D**** révélée dans les conditions dénaturantes non réductrices, de masses moléculaires approximatives de 100 KDa et 37 KDa respectivement.

D'après la littérature, ces groupes de protéines correspondent à la chaîne légère de myosine (100 KDa) et la chaîne constante région $\alpha 1$ des immunoglobulines (environ 37 KDa) (46). Donc probablement, la disparition de ces deux chaînes, autrement dit l'absence d'expression des

immunoglobulines et de la myosine dans le milieu salivaire chez les patients malades est une des conséquences de la maladie rénale sur le protéome salivaire.

Un autre exemple, concerne une protéine exprimée que chez les malades et absente totalement chez le témoin. Il s'agit des bandes D3, D4, D5 révélées dans les conditions dénaturantes réductrices, de masses moléculaires approximatives de 45 KDa, 25 KDa et 15 KDa respectivement, ainsi que les bandes D*, D***, D***** révélées dans les conditions dénaturantes non réductrices, de masses moléculaires approximatives de 200 KDa, 45 KDa et 15 KDa respectivement.

D'après la littérature, ces groupes de protéines peuvent correspondre à l'alpha amylase salivaire (environ 45 KDa), la lipase linguale (25 KDa), la cystatine ou bien le lysozyme (aux environs de 15 KDa), les mucines (plus de 200 KDa). Donc probablement, une autre conséquence des atteintes rénales sur le protéome salivaire est l'expression de ces protéines chez les patients malades, au niveau de la cavité buccale lors de l'hydrolyse et la digestion par les enzymes ; ou lors de la lubrification par les mucines ou bien lors de la protection des tissus buccaux contre les protéases à cystéine par leur inhibiteur la cystatine.

Un dernier exemple des protéines exprimées chez le témoin et les patients malades, la D2 révélée dans les conditions dénaturantes réductrices de masse moléculaire approximative de 75 KDa, la D** révélée dans les conditions dénaturantes non réductrices de masse moléculaire approximative de 150 KDa. Ces protéines montrent des variations d'expression quantitatives avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles du témoin. Certaines protéines sont surexprimées, d'autres sont à l'état de trace.

D'après la littérature, les groupes de protéines situés aux environs de 75 KDa peuvent correspondre à la lactoferrine alors que celles qui sont situées aux environs de 150 KDa peuvent correspondre aux immunoglobulines surtout les IgG et IgA. Probablement, les fluctuations quantitatives de certaines protéines exprimées sont donc une des conséquences d'une maladie rénale sur le protéome salivaire.

Ces différences d'expression sont autant des facteurs d'intérêt (biomarqueurs) pour l'analyse de l'influence de différents types de maladies rénale sur la composition en protéines salivaires celles-ci étant susceptibles d'être spécifiquement exprimées ou inhibées au cours de cette pathologie.

Ces protéines salivaires variantes peuvent être secondairement fractionnées par électrophorèse bidimensionnelle et caractérisées par spectrométrie de masse afin de préciser si elles sont susceptibles d'être considérées comme marqueurs de la maladie rénale.

II. Fractionnement des protéines urinaires et recherche de biomarqueurs

La recherche et le dosage de protéine dans les urines renseignent sur le bon fonctionnement du rein et leur présence traduit le plus souvent une atteinte des glomérules (78). L'électrophorèse des protéines urinaires permet de montrer les protéinuries séparées en fonction de leur poids moléculaire et/ou de leur charge, responsables d'une mobilité différenciée en gel de polyacrylamide (13). Elle est en particulier utile au diagnostic et au suivi du syndrome néphrotique (78).

1. Analyse des profils électrophorétiques

Pour le fractionnement des protéines urinaires, la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée. C'est une technique qui permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes nous permet de révéler la mobilité de chacune de ces bandes protéiques réparties dans les deux zones de protéines de haut et de faible poids moléculaire (HPM et FPM), en mesurant la distance parcourue par chaque protéine dans le gel de séparation.

1.1. Analyse des protéines urinaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE

Les diagrammes électrophorétiques des échantillons analysés renferment de 1 à 29 bandes protéiques décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines urinaires avec des mobilités variant entre 18 et 140 mm (Figure 9).

Nous avons dénombré 39 bandes protéiques de mobilités différentes : 17 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines urinaires HPM et 22 bandes dans la zone 2 des protéines urinaires FPM, caractérisées par des gammes de masses moléculaires approximatives de 250-50 KDa et de 50-10 KDa respectivement.

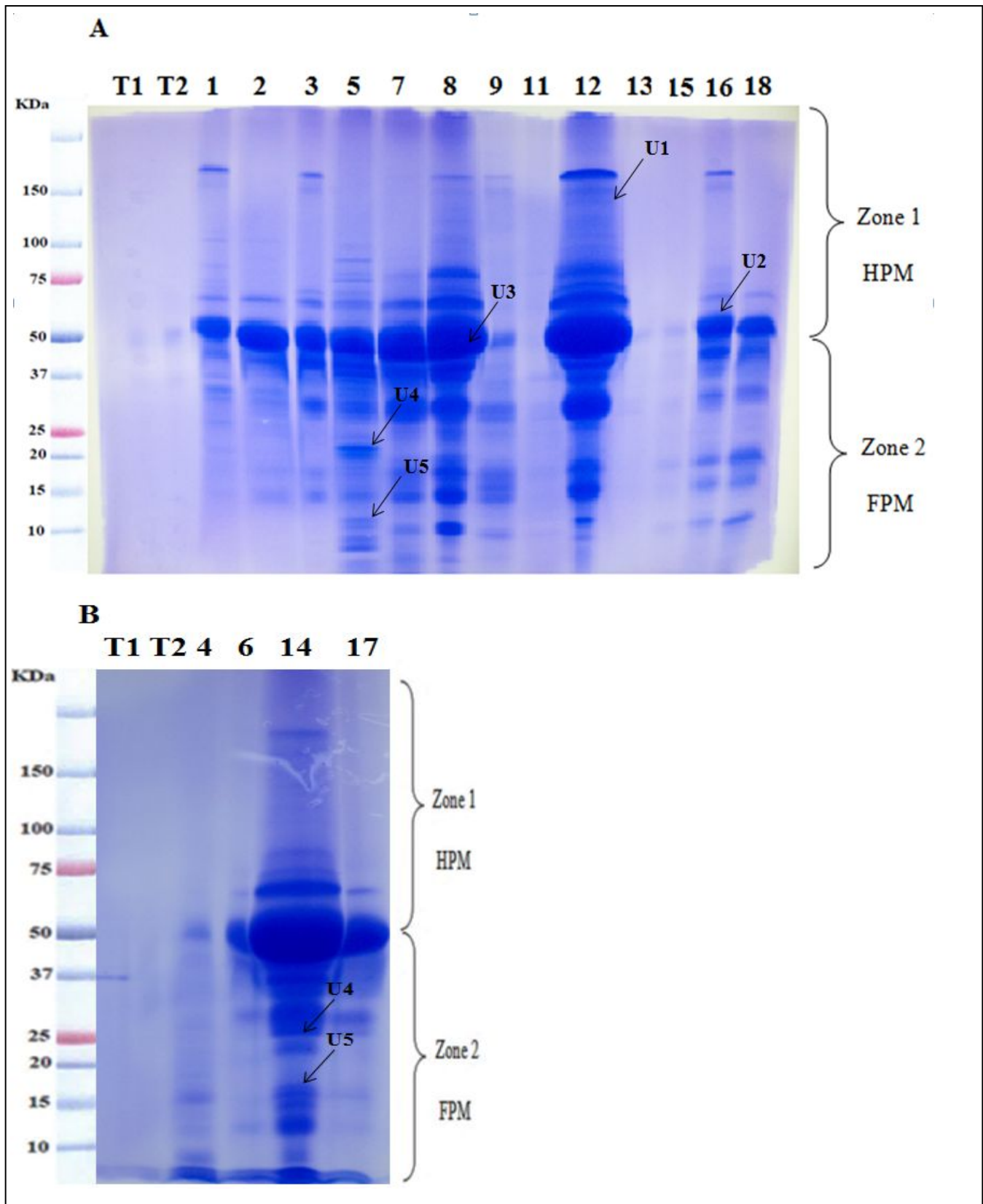


Figure 9 : profils électrophorétiques des protéines urinaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. A : T1, T2 : Témoin. 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18 : patients malades B : T1, T2 : Témoin. 4, 6, 14, 17 : patients malades.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et des sujets sains révèle des variations dans la composition protéique dans les deux zones des protéines urinaires HPM et FPM. Cinq bandes protéiques nommées U1, U2, U3, U4 et U5 sont les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces dernières est représentée dans le tableau 13.

Nous constatons clairement des différences entre les sujets sains et les sujets malades dans la composition protéique où les bandes U1, U2, U4, U5 varient qualitativement et sont présentes uniquement chez certains sujets malades alors que la bande U3 variable quantitativement est présente également dans le profil des sujets sains avec une faible intensité par rapport au sujets malades 16, 5 et 12 selon un ordre d'intensité croissant. Cette bande n'est pas exprimée chez le patient 11. La bande U5 variable qualitativement et quantitativement au même temps est absente chez les sujets sains ainsi que chez les patients 11 et 16, ce qui n'est pas le cas pour les malades 5 et 12 avec des intensités différentes où sa concentration est plus élevée chez le patient 12.

Tableau 13 : variation des bandes protéiques U1, U2, U3, U4, U5.

	U1/Intensité	U2/Intensité	U3/Intensité	U4/Intensité	U5/Intensité
Témoins	A(0)	A(0)	P (traces)	A(0)	A(0)
E5	A(0)	A(0)	P(++)	P(+)	P(+)
E11	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
E12	P(traces)	A(0)	P(+++)	A(0)	P(++)
E16	A(0)	P(+)	P(+)	A(0)	A(0)

P : présence

A : absence

E : échantillon

Etant donné, que la bande protéique U3 n'existe presque que chez les témoins, nous pouvons la suggérer comme un biomarqueur de la maladie rénale et dans ce cas, elle peut être un biomarqueur de nécrose tubulaire aigue. D'après (39), une protéine qui existe chez un sujet sain et absente chez les sujets malades, peut être considérée comme un biomarqueur de la pathologie.

Nous avons observé également des différences dans la composition protéique urinaire entre les malades. Ainsi, la bande U1 est présente seulement chez le patient 12 présentant une néphropathie lupique GEM stade II, à l'état de trace, alors que la bande U2 existe uniquement chez le patient 16 souffrant d'une insuffisance rénale terminale. La bande U4 est exprimée uniquement chez le patient 5 présentant un syndrome néphrotique impur et une insuffisance rénale aigue. Concernant la bande U3, elle est exprimée physiologiquement chez les témoins.

L'excrétion urinaire physiologique des protéines plasmatiques, essentiellement l'albumine dépend de nombreux facteurs individuels tels que l'activité physiologique, la pression sanguine ou la consommation d'alcool. Il existe d'autres protéinuries bénignes dues au stress, à l'exposition au froid. Chez les adolescents, on observe souvent une protéinurie orthostatique ou d'effort(91). Cette bande est surexprimée chez le patient 12 que chez les patients 5 et 16 tandis qu'elle est totalement absente chez le patient 11. Finalement la bande U5 est présente seulement chez les patients 12 et 5 mais celle-ci elle est plus observable chez le patient 12.

1.2. Analyse des protéines urinaires dénaturées et non réduites fractionnées par SDS-PAGE

Les diagrammes électrophorétiques des échantillons analysés renferment de 2 à 41 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines urinaires de haut et de faible poids moléculaire avec des mobilités allant de 4 jusqu'à 142 mm (Figure 10).

Nous avons identifié 48 bandes protéiques réparties comme suit : 28 bandes protéiques dans la zone 1 de protéines urinaires HPM caractérisée par la gamme de masse moléculaires approximatives de 250-50 KDa et 20 bandes protéiques dans la zone 2 de protéines urinaires FPM caractérisée par la gamme de masse moléculaires approximatives de 50-10 KDa.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et des sujets sains révèle des variations dans la composition protéique urinaire où les différences résident dans les deux zones contenant les bandes U', U'', U''', U''''', U'''''' (Figure 10) représentant les bandes les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces bandes protéiques est représentée dans le tableau 14.

Tableau 14 : variation des bandes protéiques U', U'', U''', U''''', U''''''

	U'/Intensité	U''/Intensité	U'''/Intensité	U'''''/Intensité	U''''''/Intensité
Témoins	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)
E3	A(0)	A(0)	P(++)	P(+++)	A(0)
E8	P(traces)	P(traces)	P(++)	P(+++)	P(+)
E9	P(traces)	P(traces)	P(+)	P(+++)	P(+)
E15	A(0)	P(++)	P(+)	P(+++)	A(0)

P : présence A : absence E : échantillon

Des différences sont constatées entre les sujets sains et les patients malades dans la composition protéique où les bandes U', U'', U''', U'''''' existent seulement chez certains malades d'une manière différentielle alors qu'elles sont totalement absentes chez les sujets sains. D'après (81), les caractéristiques biologiques identifiées uniquement dans l'échantillon

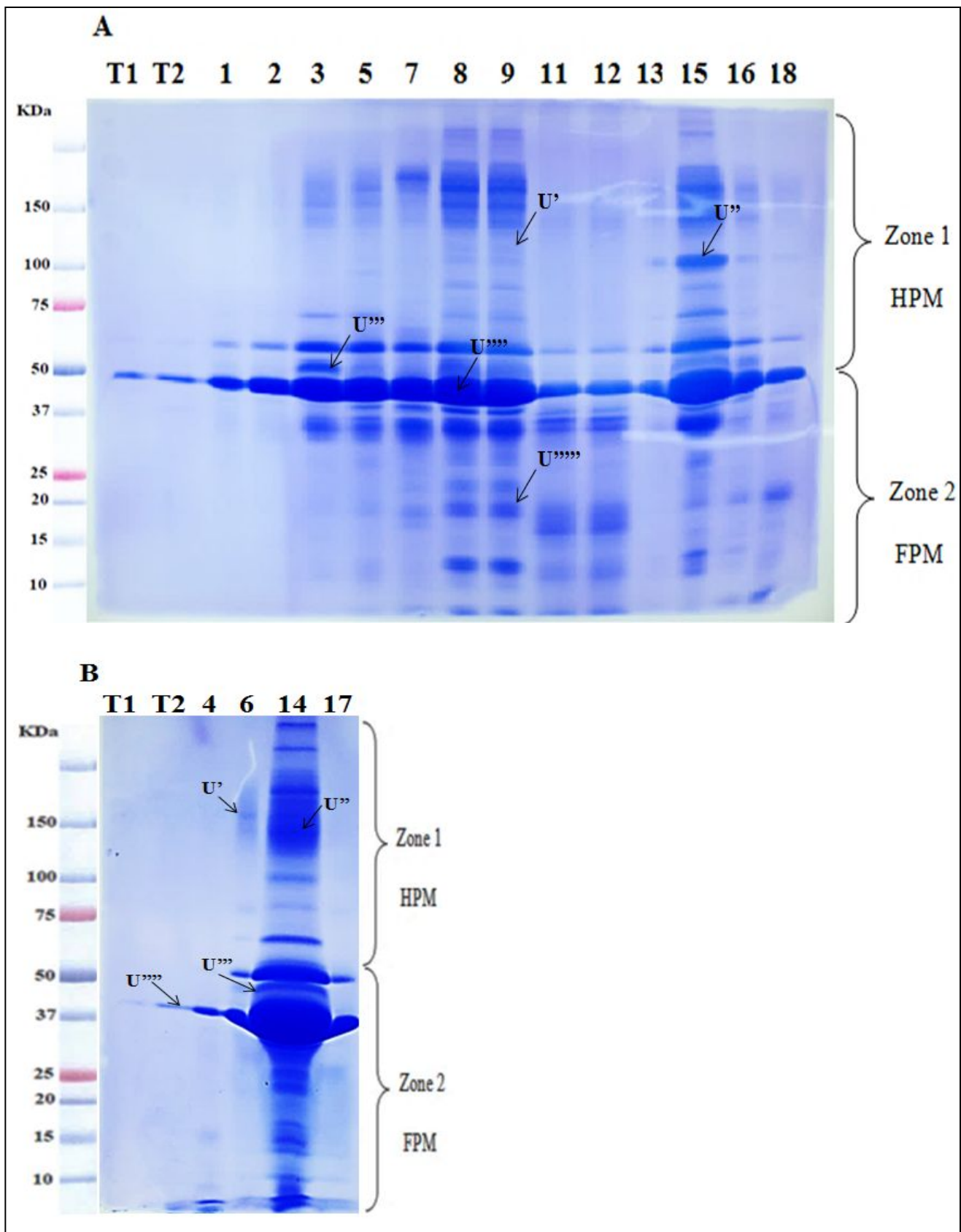


Figure 10 : profils électrophorétiques des protéines urinaires dans les conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE. A : T1, T2 : Témoin. 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18 : patients malades. B : T1, T2 : Témoin. 4, 6, 14, 17 des malades.

du patient par mesures répétées ou différentiellement par rapport à un témoin peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs de l'état physiologique correspondant.

Par contre la bande U'''' existe chez les malades que chez les sujets sains mais avec une intensité plus élevée chez les malades, ce qui confirme l'atteinte rénale soit par le syndrome néphrotique et l'amylose : c'est le cas du patient 3, soit par un syndrome néphrotique et IRA : c'est le cas de patient 8 ou encore la NTA comme le patient 9 ou bien par IRC comme le patient 15.

2. Étude de la variabilité des protéines urinaires

2.1. Étude de la variabilité des protéines urinaires dénaturées et réduites

2.1.1. Étude des protéines urinaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 19 échantillons a permis de distinguer 17 types de protéines urinaires de haut poids moléculaire (Tableau 15).

Tableau 15 : variabilité des protéines urinaires de HPM

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
B1	18	E1, E3, E8, E9, E12, E16, E14	37
B2	24	E1, E3, E8, E9, E12, E16, E14	37
B3	27	E12	5
B4	31	E8, E12	11
B5	33	E12, E14	11
B6	37	E1, E8, E12, E14	21
B7	40	E1, E2, E8, E12, E14	26
B8	42	E5, E8, E12, E14	21
B9	44	E2, E5, E7	16
B10	46	E1, E8, E12, E14	21
B11	49	E2, E5, E7, E8, E11, E12, E16	37
B12	51	E1, E2, E5	16
B13	53	E1, E3, E5, E8, E12, E16, E14	37
B14	58	E1, E2, E3, E5, E7, E8, E12, E16, E18, E14	53
B15	60	E7, E8, E16	16
B16	63	T1,T2, E1, E2, E3, E5, E7, E8, E9, E12, E13, E15, E16, E18, E4, E6, E14, E17	95
B17	72	E1, E2, E3, E5, E7, E8, E12, E16, E18	47

Dans cette zone de haut poids moléculaire (Figure 10), la variabilité des bandes protéiques est peu importante. La bande protéique 16 de mobilité 63 mm dispose de la fréquence la plus importante qui est de 95% et est présente chez 18 échantillons. Elle constitue la protéine urinaire dominante de la zone 1, suivie par la bande 14 de mobilité 58 mm retrouvées dans 10 échantillons, puis la bande 17 de mobilité 72 mm retrouvées dans 9 échantillons. Ensuite viennent les bandes 1, 2, 11, 13 de mobilité 18, 24, 49, 53 mm respectivement repérées dans 7 échantillons avec une fréquence égale à 37%. La bande 7 de mobilité 40 mm est retrouvée dans 5 échantillons seulement.

Enfin les bandes protéiques les moins fréquentes sont 6, 8, 10 de mobilités 37, 42, 46 mm respectivement. Chacune est présente dans 4 échantillons. Les bandes 9, 12, 15 de mobilités 44, 51, 60 mm respectivement sont présentes dans 3 échantillons et les bandes 4, 5 de mobilités 31, 33 mm respectivement sont présentes dans 2 échantillons. La bande 3 de mobilité 27 mm dispose de la fréquence la moins élevée qui est de 5% et est présente chez 1 seul échantillon, (Tableau 15).

2.1.2. Etude des protéines urinaires de FPM

L'analyse électrophorétique des 19 échantillons a permis de distinguer 22 types de protéines urinaires de faible poids moléculaire (Tableau 16).

Tableau 16 : variabilité des protéines urinaires de FPM

Bandes	Mobilités (mm)	Échantillons	Fréquences %
B18	80	E5, E8, E11, E12, E16, E18, E6, E14, E17	47
B19	82	E1, E2, E5, E8, E12	26
B20	84	E1, E2, E5	16
B21	86	E2, E5, E14	16
B22	88	E1, E2, E3, E5, E7, E8, E9, E12, E13, E15, E16, E18	63
B23	92	E5, E7, E8, E12, E13, E16, E18, E14	42
B24	93	E1, E2, E3, E5, E7, E8, E9, E11, E12	47
B25	94	E1, E2, E5	16
B26	95	E1, E7, E8, E9, E11, E12, E18, E6, E14, E17	53
B27	100	E5, E7, E8, E12, E16, E18	32
B28	102	E5, E4, E14, E17	21
B29	105	E1, E5, E8	16
B30	106	E5, E7, E8, E12, E4, E14	32
B31	109	E5, E7, E8, E9, E11, E12, E15, E16, E18	47
B32	110	E2, E3, E5, E7, E8, E9, E11, E16, E18	47
B33	115	E5, E9, E12, E16, E18, E4, E14	37
B34	118	E1, E2, E3, E5, E7, E8, E9, E12, E15, E16	53
B35	125	E5, E12, E14	16
B36	128	E5, E7, E8, E9, E11, E12, E18, E4, E14, E17	53
B37	131	E5, E8, E12, E14	21
B38	134	E5, E4, E6, E14, E17	26
B39	140	E5, E7, E8, E9, E12, E4, E14	37

La bande 22 de mobilité 88 mm dispose de la fréquence la plus élevée qui est de 63%, elle est considérée comme étant la protéine urinaire dominante dans cette zone de faible poids moléculaire. Elle est suivie par les bandes protéiques 26, 34, 36 de mobilités 95, 118, 128 mm successivement qui sont localisées dans 10 échantillons avec une fréquence de 53%.

Par la suite apparaissent les bandes 18, 24, 31, 32 de mobilités 80, 93, 109, 110 mm avec une fréquence de 47% répertoriées chez 9 échantillons, suivies par la bande 23 de mobilité 92 fréquente chez 8 échantillons. Les bandes protéiques 33, 39 de mobilités 115, 140 mm successivement sont retrouvées localisées dans 7 échantillons avec une fréquence de 37%. Les bandes 27, 30 de mobilités 100, 106 mm avec 32% sont répertoriées chez 6 échantillons, suivies par les bandes 19, 38 de mobilités 82, 134 mm respectivement avec une fréquence égale à 26% et les bandes 28 et 37 de 102, 131 mm repérées chez 4 échantillons.

Enfin les bandes protéiques 20, 21, 25, 29, 35 de mobilités 84, 86, 94, 105, 125 mm successivement disposent de la fréquence la moins élevée qui est de 16% et sont présentes seulement chez 3 échantillons (Tableau 16).

2.2. Étude de la variabilité des protéines urinaires dénaturées et non réduites

2.2.1. Étude des protéines urinaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 19 échantillons a permis de distinguer 28 types de protéines urinaires de haut poids moléculaire (Tableau 17).

Une fréquence de 100% est observée chez les 19 échantillons et concerne la bande 28 de mobilité 70 mm, suivie de la bande 13 de mobilité 36 mm présente chez 11 échantillons avec une fréquences de 58%, ensuite vient la bande 11, de mobilité 22 mm présente chez 10 échantillons avec une fréquences moyenne de 53 %.

La plus faible fréquence est de 5% pour la bande 9 de mobilité 20 mm qui est présente chez un seul échantillon seulement (Tableau 17).

Tableau 17 : variabilité des protéines urinaires de HPM

Bandes	Mobilités (mm)	Échantillons	Fréquences %
B1	4	E5, E8, E9, E11, E12, E15, E16	37
B2	7	E8, E9, E14, E15	21
B3	10	E8, E9	11
B4	12	E8, E9, E14	16
B5	15	E8, E9	11
B6	17	E7, E8, E9, E14, E15, E16	32
B7	18	E15, E16	11
B8	19	E8, E9, E15	16
B9	20	E15	5
B10	21	E7, E8, E9, E15, E16	26
B11	22	E3, E5, E7, E8, E9, E13, E14, E15, E16, E18	53
B12	30	E3, E5, E7, E8, E9, E14, E15, E16, E18	47
B13	36	E3, E5, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16	58
B14	38	E14, E15	11
B15	40	E14, E15	11
B16	43	E6, E8, E9, E14	21
B17	46	E5, E8, E9, E13, E14, E15, E16, E18	42
B18	48	E14, E15	11
B19	51	E5, E8, E9, E14	21
B20	52	E8, E9	11
B21	54	E8, E9, E14, E15, E16	26
B22	59	E7, E8, E9, E14	21
B23	61	E8, E9	11
B24	62	E1, E2, E3, E5, E8, E9, E13, E15, E16	47
B25	63	E3, E5, E6, E8, E9, E14, E15, E16, E17	47
B26	66	E5, E6, E7, E8, E9, E14, E15	37
B27	68	E7, E8, E9, E14, E15	26
B28	70	T1, T2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18	100

2.2.2. Étude des protéines urinaires de FPM

L'analyse électrophorétique des 19 échantillons a permis de distinguer 20 types de protéines urinaires de faible poids moléculaire (Tableau 18).

Tableau 18 : variabilité des protéines urinaires de FPM

Bandes	Mobilités (mm)	Échantillons	Fréquences %
B29	78	E1, E2, E3, E5, E6, E8, E9, E11, E12, E14	53
B30	80	T1, T2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18	100
B31	83	E1, E2, E3, E5, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E15, E16, E18	68
B32	92	E3, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18	74
B33	96	E3, E5, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E15, E16, E18	58
B34	100	E3, E5, E7, E8, E9, E11, E12, E15, E16, E18	53
B35	103	E8, E9, E14, E15	21
B36	104	E6, E8, E9, E14, E15	26
B37	106	E5, E8, E9, E11, E12, E14, E15	37
B38	107	E7, E14, E15	16
B39	113	E8, E9, E14, E15	21
B40	115	E7, E8, E9, E14, E15	26
B41	120	E8, E9, E18	16
B42	122	E3, E5, E7, E8, E9, E11, E12, E14, E15, E16, E18	58
B43	128	E7, E11, E12, E14, E15, E18	32
B44	130	E4, E7, E8, E9, E11, E12, E14, E15, E16	47
B45	131	E6, E8, E9, E14, E16, E17	32
B46	135	E5, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E18	53
B47	137	E5, E6, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E16, E17, E18	58
B48	142	E3, E5, E8, E9, E11, E12, E14, E15	42

La bande 30 est la plus fréquente de mobilité 80 mm présente chez tous les échantillons avec une fréquence de 100%, puis vient la bande 32 de mobilité 92 mm avec une fréquence de 74% retrouvée chez 14 échantillons, ensuite apparait la bande 31 avec une fréquence de 68% présente dans 13 échantillons avec une mobilité de 83 mm. Par la suite vient la bande 33 de mobilité 96 mm, la bande 42 de mobilité 122 mm et la bande 47 de mobilité 137 mm avec une fréquence de 58 % retrouvée chacune chez 11 échantillons, ensuite apparaissent les bandes 29, 34, 46 avec une fréquence de 53 % présentes dans 10 échantillons avec des mobilités successives de 78 mm, 100 mm, 135 mm. Le reste des bandes protéiques présentent des fréquences allant de 21% à 42% (Tableau 18).

3. Classification hiérarchique des protéines urinaires

3.1. Dendrogramme des protéines urinaires dénaturées et réduites

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation nous montre de nombreux groupes permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons (Figure 11).

L'ensemble des échantillons est scindé en deux principaux groupes à la distance d'agrégation 4,0. En effet, le deuxième groupe contient le patient 5 uniquement alors que le premier groupe est subdivisé en trois sous-groupe dont le troisième constitue un groupe à part portant le patient 14 tandis que le deuxième sous-groupe est composé de deux patients formant un clade avec des niveaux de similarités élevés (patients 8 et 12). Le premier sous-groupe divisé à son tour en deux, le second constitue un groupe à part (patient 2) par contre le premier reste polymorphe et renferme un grand nombre d'échantillons. Ce dernier est subdivisé à des niveaux d'agrégations différents, à un niveau de 3,15, il est composé d'un seul malade (patient 1), à une distance d'agrégation de 3, il comprend deux branches. La deuxième inclut le patient 7 et l'autre comprend 5 groupes : les patients 3, 9, 16, 18 respectivement forment chacun un groupe à part et le cinquième montre plusieurs subdivisions. Deux clades avec des niveaux de similarités élevés entre les patients 6 et 17, T1 et T2.

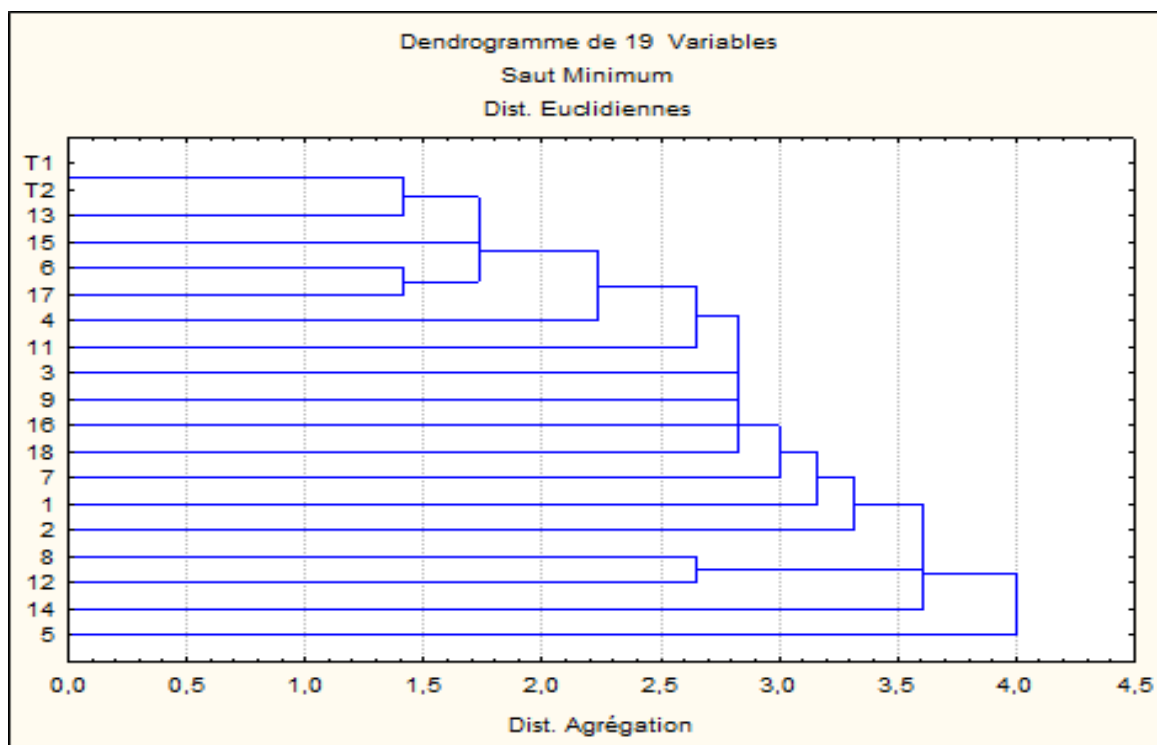


Figure 11 : dendrogramme des 19 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices

A la distance 2,25 qui correspond à la valeur moyenne des distances d'agrégation (Figure 12), le dendrogramme révèle un degré de similitude de la composition en protéines urinaires de quelques échantillons.

Les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines urinaires et l'état physiologique et pathologique des patients ne sont pas corrélés, autrement dit certains patients appartiennent au même groupe malgré les différences qui subsistent entre eux.

Par exemple les patients 8 et 12 appartiennent au même groupe en formant un clade, malgré que le patient 8 est un homme hypertendu âgé de 32 ans atteint de syndrome néphrotique et insuffisance rénale aigue avec une protéinurie de 5,9 par contre la patiente 12 est une femme hypertendue âgée de 28 ans atteinte de néphropathie lupique sur GEM stade II avec une protéinurie de 7,5.

D'autres patients sont corrélés entre eux, autrement dit la composition en protéines urinaires confirment leurs ressemblance dans leurs caractéristiques cliniques c'est le cas des patients 6 et 17. La patiente 6 une femme âgée de 35 ans atteinte d'un syndrome néphrotique impur avec une protéinurie de 8 presque proche à la patiente 17 qui est une femme âgée de 59 ans atteinte d'un syndrome néphrotique avec une protéinurie 8,6.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que le type d'atteinte rénale peut avoir des répercussions sur la composition protéique des urines. Dans les atteintes rénales glomérulaires et/ou tubulaires, lorsque les membranes sont endommagées, une protéinurie est observée (91). L'augmentation concomitante d'une ou plusieurs protéines de faible PM indique que cette protéinurie résulte d'une diminution de la réabsorption tubulaire, alors que l'augmentation de la sécrétion urinaire d'albumine seule ou concomitante à celle d'une autre protéine de PM élevé indique une lésion primaire du glomérule(36).

3.2. Dendrogramme des protéines urinaires dénaturées et non réduites

L'ensemble des échantillons est scindé en deux principaux groupes à la distance d'agrégation 4,25 (Figure 12). En effet, le premier groupe est polymorphe contrairement au second groupe qui contient deux subdivisions : dans chaque subdivision se forme un clade entre les patients 14 et 15, 8 et 9. Concernant le premier groupe, il se subdivise en deux à la distance d'agrégation 3,5 où le patient 7 constitue un groupe à part, et une autre subdivision en deux à distance 3,25 contenant un groupe à part (le patient 16). Une autre ramification est formée à la distance 3 contenant 3 branches bien définies, la troisième renferme un clade entre le patient

11 et 12, la deuxième renferme un clade entre le patient 3 et 5, la première renferme un clade entre le patient 13 et 18 plus une autre subdivision à la distance d'agrégation 2 où chacun des deux malades 6 et 17 forme un groupe à part plus un autre à la distance 1,5 où les patients 1 et 2 et les témoins T1 et T2 présentent entre eux des niveaux de similarités élevés.

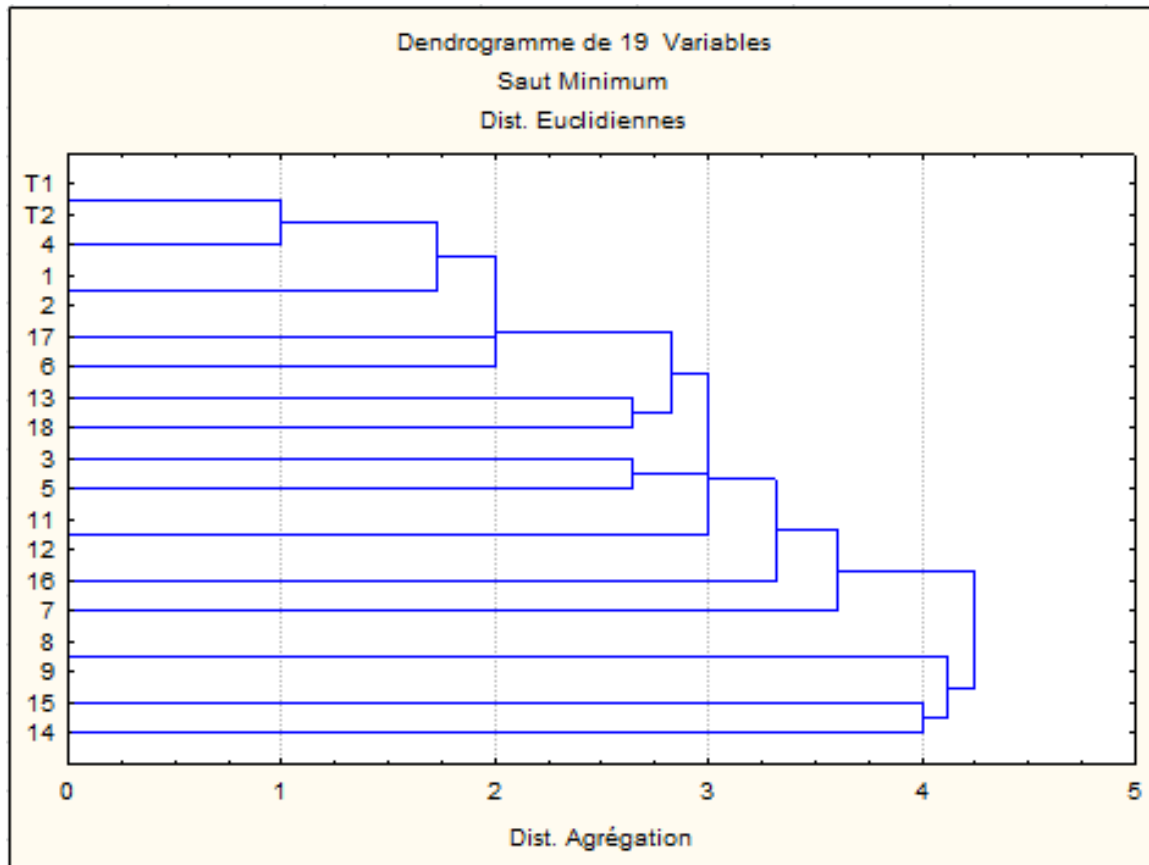


Figure 12 : dendrogramme des 19 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices

L'analyse en cluster de la composition en protéines urinaires peut être corrélée, autrement dit certains patients appartiennent au même groupe confirmant leurs ressemblance dans leurs caractéristiques cliniques, c'est le cas des patients 1 et 2 qui appartiennent au même clade. Le patient 1 est un homme âgé de 40 ans et atteint d'un syndrome néphrotique impur une protéinurie de 0,5 et le patient 2 est un homme âgé de 27 ans atteint d'un syndrome néphrotique avec une protéinurie de 1,53.

Les patients 13 et 18 forment un clade, la patiente 13 est une femme âgée de 30 ans dont le dépistage de sa maladie montre une insuffisance rénale aigue avec une élévation relative de protéinurie (0,15) ; aussi la patiente 18 est une femme hypertendue âgée de 64 ans atteinte d'une insuffisance rénale aigue avec une élévation relative de protéinurie (0,5).

Dans certains cas l'état physiologique et pathologique des patients et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines urinaires ne sont pas corrélés, autrement dit certains patients appartiennent au même groupe malgré les différences qui subsistent entre eux.

Par exemple les patients 3 et 5 forment un clade malgré les différences qu'ils présentent dans leurs caractéristiques cliniques, la patiente 3 est une femme âgée de 63 ans atteinte d'un syndrome néphrotique avec un amylose rénale. Par contre la patiente 5 est une femme âgée de 55 ans qui présente un syndrome néphrotique impur plus IRA.

Les patients 11 et 12 forment aussi un clade, malgré que la patiente 11 est une femme hypertendue âgée de 53 ans dont le diagnostic confirme une nécrose tubulaire aigue due au surdosage médicamenteux durant le traitement d'hypertension artériel sachant que le bilan urinaire montre une élévation de la valeur de protéinurie à 0,34 par contre la patiente 12 est une femme hypertendue âgée de 28 ans dont le dépistage montre une néphropathie lupique sur GEM stade II avec une élévation progressive de protéinurie à 7,5.

Les patients 8 et 9 forment un clade malgré que le patient 8 est un homme âgé de 32 ans présentant un syndrome néphrotique sur insuffisance rénale aigue avec une élévation de protéinurie à 5,9 alors que la patiente 9 est une femme âgée de 40 ans dont le diagnostic une nécrose tubulaire aigue avec une protéinurie peu élevée de 0,2.

Les patients 15 et 14 forment aussi un clade, malgré que la patiente 15 est une femme âgée de 81 ans atteinte d'une insuffisance rénale chronique tandis que le patient 14 est un homme âgé de 45 ans dont le diagnostic montre un syndrome néphrotique impur causé par un surdosage médicamenteux durant le traitement de la migraine.

4. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons

4.1. Indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et réduites

Les indices de similarités ont été effectués pour les 19 échantillons ayant une maladie rénale, ils sont représentés sous forme de matrice dans le tableau 19. Il en ressort que l'indice se situe entre 0 et 100 %.

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances comme le cas du témoin 1 et 2 avec le patient 11, entre les patients 11 et 13 (IRS= 0%) ainsi que les deux témoins 1 et 2, les patients 12 et 5 (IRS= 3%).

Inversement, lorsque les valeurs de l'indice sont élevées, les diagrammes apparaissent voisins tels que la valeur 100% qui reflète le niveau de similarité très élevé (identique) qui existe chez les sujets sains. Également les patients 8 et 12 présentent un indice de similarité maximal qui

est de 78%, suivie d'un IRS= 67% observé entre les patients 6 et 17. Une valeur moyenne de 50% est aussi observée entre certains patients, comme le patient 1 et 2, 7 et 16.

Tableau 19 : indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et réduites

T1	T2	1	2	3	5	7	8	9	11	12	13	15	16	18	4	6	14	17	
100	100	6	7	10	3	6	6	8	0	3	33	25	6	8	14	25	5	17	T1
	100	6	7	10	3	6	6	8	0	3	33	25	6	8	14	25	5	17	T2
		100	50	47	34	25	48	30	9	42	11	16	31	20	4	10	29	9	1
			100	39	47	39	30	23	16	26	13	19	29	23	5	6	12	5	2
				100	26	35	36	47	13	30	18	27	53	29	6	8	19	7	3
					100	48	54	28	20	53	10	14	41	37	24	10	42	17	5
						100	55	45	33	44	18	24	50	53	20	11	22	15	7
							100	38	25	78	11	14	52	38	13	10	47	13	8
								100	36	37	15	33	40	41	27	14	26	20	9
									100	20	0	10	21	36	8	22	12	30	11
										100	10	14	45	37	16	10	61	13	12
											100	40	19	25	11	17	9	13	13
												100	25	23	10	14	4	11	15
													100	56	10	11	27	10	16
														100	19	23	26	29	18
															100	22	32	44	4
																100	18	67	6
																	100	27	14
																		100	17

4.2. Indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et non réduites

Le calcul des indices de similarité des 19 échantillons montre que les valeurs de l'IRS varient entre 5 et 100% (Tableau 20).

La valeur d'IRS la plus élevée est 100% reflétant la similarité qui existe entre les sujets sains, aussi bien entre le patient 1 et 2, 8 et 9, 11 et 12 (diagrammes identiques). En outre, la valeur d'IRS la plus élevée pour cette condition est de 67%. Cette dernière est présente entre les témoins 1, 2 et le patient 4. Une valeur moyenne de 50% est aussi observée entre certains patients, comme les patients 3 et 11, 3 et 12, 3 et 16, 11 et 18, 12 et 18, 13 et 16. Des valeurs moins élevées, sont aussi présentes et concernent les témoins 1 et 2 avec les patients 8 et 9 avec une valeur d'IRS=5 %.

Tableau 20 : Indice de similarité des protéines urinaires dénaturées et non réduites

T1	T2	1	2	3	5	7	8	9	11	12	13	15	16	18	4	6	14	17	
100	100	40	40	14	10	11	5	5	13	13	18	6	9	14	67	20	6	33	T1
	100	40	40	14	10	11	5	5	13	13	18	6	9	14	67	20	6	33	T2
		100	100	36	24	14	12	12	24	24	33	11	17	19	33	17	6	22	1
			100	36	24	14	12	12	24	24	25	11	17	18	33	25	8	22	2
				100	19	43	34	34	50	50	47	35	50	47	13	26	26	25	3
					100	38	51	51	61	61	52	46	59	52	9	29	41	24	5
						100	41	40	40	40	32	49	46	43	16	16	36	14	7
							100	100	36	36	37	23	49	31	7	24	61	16	8
								100	36	36	27	61	36	31	7	24	66	15	9
									100	100	42	37	46	50	19	24	32	22	11
										100	42	37	46	50	19	24	32	22	12
											100	27	50	53	17	24	22	31	13
												100	53	32	8	15	63	11	15
													100	52	14	25	37	26	16
														100	13	20	26	25	18
															100	18	9	29	4
																100	29	60	6
																	100	18	14
																		100	17

A la lumière de tous ces calculs d'indice, nous concluons que quel que soit la condition utilisée, il existe une similitude élevée entre certains patients présentant naturellement une ressemblance dans leur composition protéique et leur état physiologique et /ou pathologique. A l'inverse d'autres patients ayant une origine physiologique et /ou pathologique éloignée montrent des IRS faibles.

Cette comparaison des profils des protéines totales urinaires obtenues par électrophorèse en présence de SDS peut être fiable pour grouper un certain nombre de patients.

5. Conséquence des différentes atteintes rénales sur le protéome urinaire

L'analyse comparative des profils électrophorétiques des protéines urinaires extraites dans deux conditions différentes : dénaturantes réductrices et dénaturantes non réductrices montre qu'environ 5 bandes protéiques communes entre les différents échantillons, nommées U1, U2, U3, U4 et U5 (Figure 9), U', U'', U''', U'''' et U'''''(Figure 10), présentent une variation d'expression qualitative et quantitative et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente par rapport à celles obtenus sur le profil du témoin.

Un exemple de protéine exprimée que chez les témoins et absente chez un patient atteint d'un NTA ; la bande U3 révélée dans les conditions dénaturantes et réductrices de masse moléculaire approximative de 55 KDa.

D'après la littérature, ces groupes de protéines correspondent aux Albumine (environ 67 KDa). Donc probablement, la disparition complète de l'albumine, autrement dit l'absence d'expression d'albumine dans le milieu urinaire chez les patients malades est une des conséquences de NTA sur le protéome urinaire.

Un autre exemple, concerne les protéines exprimées que chez les malades et absentes totalement chez le témoin. Il s'agit des U1, U2, U4 et U5 révélées dans les conditions dénaturantes réductrices, de masses moléculaires approximatives de 150 KDa, 55 KDa, 21 KDa et 12 KDa respectivement. Et les bandes U', U'', U''', U'''''' révélées dans les conditions dénaturantes non réductrices, de masses moléculaires approximatives de 150 KDa, 100 KDa, 55 KDa et 20 KDa respectivement.

D'après la littérature, ces groupes de protéines peuvent correspondre aux protéines de haut poids moléculaire comme les immunoglobulines (de 100 à 150 KDa) et l'albumine (67 KDa). Donc peut être la conséquence des atteintes glomérulaires sur le protéome urinaire correspond à l'expression de ces protéines HPM ainsi que les protéines de bas poids moléculaire comme le rétinol binding protein RBP (21 KDa), le lysozyme, la cystatine C ou bien les β 2 microglobulines (aux environs de 12 KDa). Donc probablement, une autre conséquence des atteints tubulaires sur le protéome urinaire.

Un dernier exemple des protéines exprimées chez le témoin et les patients malades avec des intensités différentes. La U3 révélée dans les conditions dénaturantes réductrices et la bande U'''''' révélée dans les conditions dénaturantes non réductrice de masse moléculaire approximative de 55 KDa. Ces protéines montrent des variations d'expression quantitatives avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles du témoin. Certaines protéines sont surexprimées, d'autres sont à l'état de trace.

D'après la littérature, ces protéines situées aux environs de 55 KDa peuvent correspondre à l'albumine. Probablement, les fluctuations quantitatives de certaines protéines exprimées sont donc une des conséquences d'une maladie rénale (SN, NTA, Néphropathie lupique sur GEM stade II, IRA ou IRC) sur le protéome urinaire.

Ces différences d'expression sont autant des facteurs d'intérêt (biomarqueurs) pour l'analyse de l'influence de différents types de maladies rénales sur la composition en protéines urinaires, celles-ci étant susceptibles d'être spécifiquement exprimées ou inhibées au cours de

cette pathologie. Ces protéines urinaires variantes peuvent être secondairement fractionnées par électrophorèse bidimensionnelle et caractérisées par spectrométrie de masse afin de préciser si elles sont susceptibles d'être considérées comme marqueurs de la maladie rénale.

III. Comparaison des profils protéiques urinaires et salivaires

L'analyse des profils protéiques des patients ayant différentes atteintes rénales (SN, NTA, IRA, IRC) montre une prédominance des bandes protéiques dans le profil salivaire plus que dans le profil urinaire chez les patients 6 et 11 (Figure 13) ce qui n'est pas le cas chez les profils protéiques des patients 15 et 8 (Figure 14) montrant une prédominance des bandes protéiques dans le profil urinaire plus que dans le profil salivaire.

Chez le patient 6 le profil salivaire présente 3 bandes variantes D3, D4 et D5 (Figure 13) qui correspondent selon leurs poids moléculaire et d'après la littérature à l'alpha amylase, la lipase linguale et la cystatine et/ou le lysozyme, respectivement. Elles peuvent être considérées donc comme de nouveaux biomarqueurs du syndrome néphrotique. Alors que le profil urinaire présente une surexpression observable de la bande U3 (Figure 13) correspondant à l'albumine. Donc la combinaison des deux résultats obtenus de la salive et de l'urine permet d'améliorer le diagnostic d'un syndrome néphrotique.

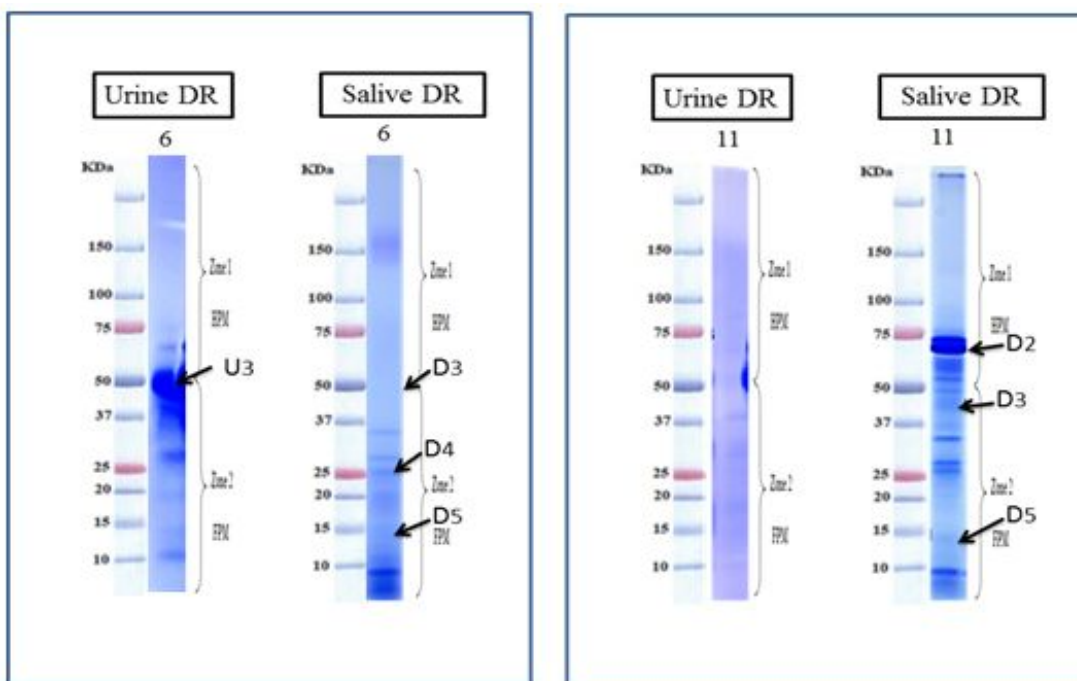


Figure 13 : Comparaison des profils électrophorétiques des protéines urinaires et salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE.

Chez le patient 11 le profil salivaire présente 3 bandes variantes D2, D3 et D5 (Figure 13) correspondant d'après la littérature la lactoferrine, l'alpha amylase et la cystatine et/ou le lysozyme, respectivement. Ces protéines peuvent être considérés comme de nouveaux biomarqueurs de la nécrose tubulaire aigue, bien que le profil urinaire présente une absence totale de l'albumine (Figure 13) ce qui confirme l'atteinte tubulaire et le fonctionnement du filtre glomérulaire. Donc la combinaison de ces résultats obtenus à partir de la salive et les urines permettent de préciser le diagnostic de nécrose tubulaire aigue.

Chez le patient 15, le profil salivaire présente 2 bandes variantes D** et D***** (Figure 14) correspondant d'après la littérature aux immunoglobulines (IgG et IgA), la cystatine et/ou le lysozyme, respectivement. Ces protéines présentent entre elles un intervalle de masse moléculaire très large, donc elles peuvent être considérées comme de nouveaux biomarqueurs d'insuffisance rénale chronique bien que le profil urinaire présente une surexpression des trois variantes U'', U''' et U'''' correspondant successivement aux immunoglobulines et aux albumines de haut poids moléculaires ce qui confirme l'atteinte du filtre glomérulaire. L'IRC est définie comme une diminution progressive des fonctions rénales objectivée par une diminution permanente du débit de filtration glomérulaire (45). Donc la combinaison des deux résultats permet de bien préciser le diagnostic d'une insuffisance rénale chronique.

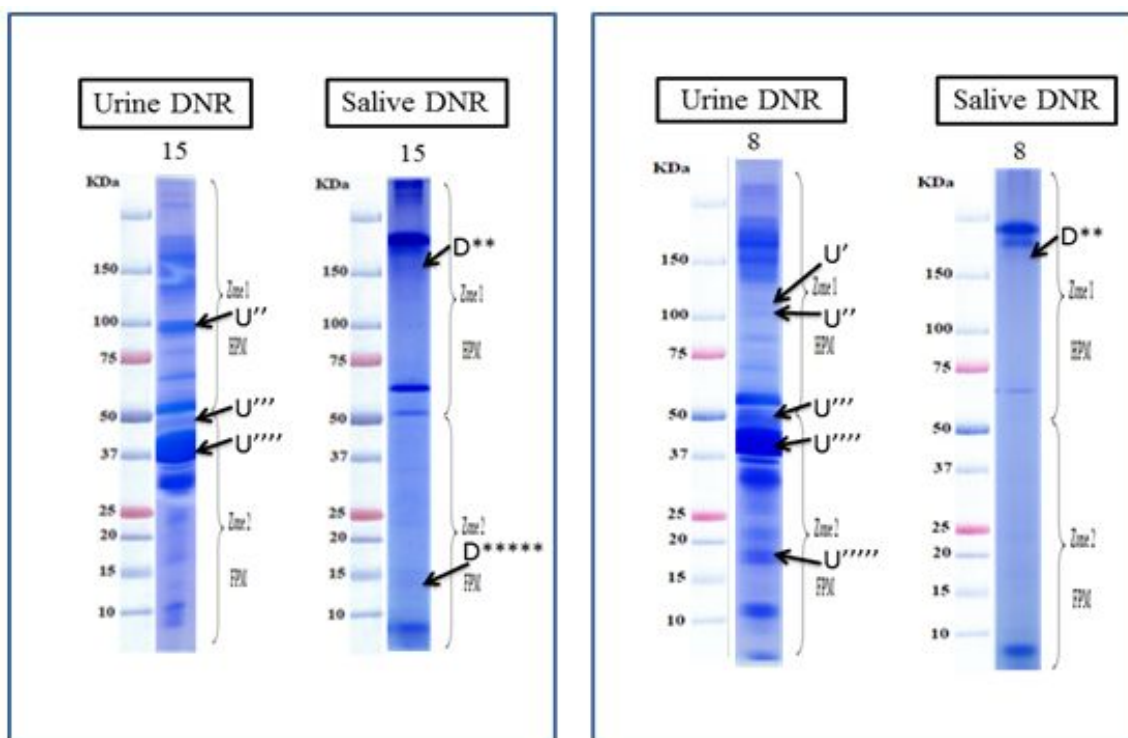


Figure 14 : Comparaison des profils électrophorétiques des protéines urinaires et salivaires dans les conditions dénaturantes non réductrices révélées par SDS/PAGE.

Chez le patient 8, le profil salivaire présente une seule bande variante D** (Figure 14) correspondant d'après la littérature aux immunoglobulines (IgG et IgA), donc ces protéines peuvent être considérées comme de nouveaux biomarqueurs salivaires d'insuffisance rénale aigue. Le profil urinaire présente une expression de cinq variantes U', U'', U''', U'''' et U''''' qui peuvent correspondre successivement aux immunoglobulines, albumine de haut poids moléculaires et le rétinol binding protein de faible poids moléculaire. Ce résultat confirme une atteinte débutante mixte glomérulaire et tubulaire. Donc la combinaison des deux résultats obtenus à partir des deux fluides biologiques permet de bien préciser le diagnostic de l'insuffisance rénale aigue.

D'après les résultats, on conclut que la salive est un fluide de diagnostic précoce, facile et non invasif, plus sensible et plus spécifique. La lipase linguale est un nouveau biomarqueur de haute spécificité pouvant être utilisé dans le diagnostic d'un syndrome néphrotique, la lactoferrine est un biomarqueur spécifique de NTA, les immunoglobulines combinées avec la cystatine et/ou le lysozyme sont de nouveaux biomarqueurs spécifiques de l'insuffisance rénale chronique alors que les immunoglobulines seules constituent un biomarqueur précis de l'insuffisance rénale aigue.

Finalement le diagnostic des atteintes rénales par la salive reste une idée très récente et il serait toujours intéressant de combiner les biomarqueurs des deux fluides (la salive et les urines) pour bien préciser le diagnostic de l'atteinte rénale.



Conclusion
et
Perspectives

Les problèmes appellent des solutions. Les solutions apportent de nouveaux problèmes.

La complexité des atteintes rénales et de la diversité des étiologies et des causes physiopathologiques font que l'utilisation de plusieurs biomarqueurs appropriés sera d'une importance critique et permettra une amélioration considérable de la prise en charge des patients souffrant d'atteintes rénales en confirmant le diagnostic précoce. Notre travail de recherche avait pour objectif d'une part d'explorer de manière aléatoire le protéome salivaire et urinaire par l'utilisation des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle réalisée sur gel polyacrylamide (SDS PAGE) et d'autre part de rechercher des biomarqueurs de l'atteinte rénale dans les deux liquides biologiques; les urines et la salive.

En amont de ce travail, notre première préoccupation est d'obtenir des profils électrophorétiques satisfaisants permettant un bon diagnostic de la maladie. Ceci nous a conduit à réaliser une extraction dans deux conditions différentes pour chaque fluide l'une dénaturante réductrice et l'autre dénaturante non réductrice, afin d'obtenir une meilleure expression possible des protéines salivaires et urinaires.

Le fractionnement des protéines salivaires et urinaires dans les deux conditions et l'analyse des différents profils électrophorétiques qui nous ont permis de :

- apprécier la diversité des protéines salivaires et urinaires dans les deux conditions d'extraction.
- constater que chacun des échantillons présente un profil protéique qui lui est propre.
- remarquer que chaque profil protéique peut ressembler ou pas à un autre par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs bandes protéiques.
- révéler les mobilités de chacune des bandes protéiques de haut et faible poids moléculaire.
- identifier des bandes protéiques communes entre les échantillons qui présentent diverses pathologies.
- déterminer les différences dans la composition protéique salivaire et urinaire des patients malades et des témoins.

Pour mieux comprendre la répercussion de l'état physiologique et pathologique de ces patients sur la composition protéique, une étude statistique a été réalisée en calculant les fréquences, l'indice de similarité et également en établissant une classification hiérarchique qui permet d'apprécier numériquement la diversité des protéines salivaires et urinaires dans les deux conditions.

L'analyse électrophorétique des protéines salivaires renferme 24 bandes protéiques de mobilités différentes pour les protéines dénaturées et réduites, réparties comme suit : 10 bandes protéiques de HPM et 14 bandes protéiques de FPM. Pour les protéines dénaturées et non réduites, 30 bandes protéiques de mobilités différentes sont dénombrées, 16 de HPM et 14 de FPM. En revanche, l'analyse électrophorétique des protéines urinaires a permis de distinguer 39 bandes protéiques de mobilités différentes pour les protéines dénaturées et réduites, 17 bandes protéiques de HPM et 22 bandes protéiques de FPM. Pour les protéines dénaturées et non réduites, 48 bandes protéiques de mobilités différentes sont observées, 28 bandes protéiques dans la zone HPM et 20 bandes protéiques dans la zone FPM.

Une nette différence est observée entre le profil des témoins et des patients atteints de la maladie rénale. Pour les protéines salivaires, environ 5 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (D1, D2, D3, D4, D5) pour les protéines extraites dans les conditions dénaturantes et réductrices et 5 bandes protéiques (D*, D**, D***, D****, D*****) pour les protéines extraites dans les conditions dénaturantes et non réductrices sont observées. Concernant les protéines urinaires, 5 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (U1, U2, U3, U4, U5) sont aussi observées dans les conditions dénaturantes et réductrices et 5 autres bandes protéiques (U', U'', U''', U''', U''') pour les protéines extraites dans les conditions dénaturantes et non réductrices. Elles sont les plus variables qualitativement et quantitativement et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente par rapport à celles obtenues sur les profils des témoins et/ou des malades.

La comparaison des profils électrophorétiques a montré deux exemples de protéines salivaires exprimées chez les témoins et relativement absentes chez les patients atteints d'une maladie rénale ; la D1 et la D**** révélées dans les deux conditions, de masses moléculaires approximatives de 100 KDa et 37 KDa, respectivement. Un autre exemple des protéines salivaires exprimées chez les malades et absentes totalement chez le témoin : la D3, D4, D5 et la D*, D**, D**** révélées dans les deux conditions, de masses moléculaires approximatives de 45 KDa, 25 KDa, 15 KDa et 200 KDa, 45 KDa et 15 KDa respectivement. Un dernier exemple des protéines salivaires exprimées chez le témoin et les patients malades ; la D2 et la D** révélées dans les deux conditions, de masse moléculaire approximatives de 75 KDa et 150 KDa, respectivement.

En ce qui concerne les protéines urinaires, un exemple de protéine exprimée chez les témoins et absente chez un patient atteint d'un NTA ; la bande U3 révélée dans les conditions dénaturantes et réductrices de masse moléculaire approximative de 55 KDa. Un autre exemple, concerne les protéines exprimées chez les malades et absentes totalement chez le témoin.

Il s'agit des bandes U1, U2, U4 et U5 révélées dans les conditions dénaturantes réductrices, de masses moléculaires approximatives de 150 KDa, 55KDa, 21KDa et 12 KDa respectivement et les bandes U', U'', U''', U'''''' révélées dans les conditions dénaturantes non réductrices, de masses moléculaires approximatives de 150 KDa, 100 KDa, 55 KDa et 20 KDa respectivement. Un dernier exemple des protéines exprimées chez le témoin et les patients malades, la U3 révélée dans les conditions dénaturantes réductrices et la U'''''' révélée dans les conditions dénaturantes non réductrices de masse moléculaire approximative de 55 KDa. Ces protéines qu'elles soient salivaires ou urinaires montrent des variations d'expression quantitatives avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles du témoin. Certaines protéines sont surexprimées, d'autres sont à l'état de trace.

L'application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais pour confirmer encore nos résultats et le diagnostic de la maladie rénale, nous avons jugé à court terme, que l'emploi de l'électrophorèse bidimensionnelle devrait accroître encore nos possibilités de trouver un ou plusieurs biomarqueurs de la maladie dans la salive et les urines, de les identifier et de les caractériser par la suite.

Nous comptons donc reprendre la même approche en utilisant une technologie permettant une séparation bidimensionnelle de haute résolution. Cela consiste en la séparation des protéines sur des strips préfabriqués lors d'une première dimension d'isoélectrofocalisation puis une séparation lors d'une deuxième dimension en fonction du poids moléculaire, dans le but d'obtenir un grand nombre de spots bien résolus. Ce travail sera poursuivi par la caractérisation de ces spots par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines susceptibles d'être considérées comme des marqueurs potentiels de cette pathologie.



*Références
bibliographiques*

- (1). ADER J. L., CARRE F., DINH-XUAN A. T., DUCLOS M., KUBIS N., MERCIER J., et al. (2003). Physiologie rénale. In : Physiologie-2ème édition. Paris : Masson, p 181.
- (2). ALAIN R., SYLVIE T. (2007). Anatomie et physiologie. Elsevier Masson SAS, p 318.
- (3). American Association for Clinical Chemistry, “Creatinine”.
- (4). AMERONGEN A.V. N., VEERMAN E.C.I. (2002). Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8 :12-22.
- (5). ANDERSON R. J., BARRY D.W. (2005). Diagnostic clinique et biologique de l’insuffisance rénale aiguë, P 1.
- (6). ARELLANO M., JIANG J., ZHOU X., ZHANG L., YE H., WONG D. T., et al. (2009). Current advances in identification of cancer biomarkers in saliva. *Front Biosci*, 1:296-303.
- (7). ARREGGER A. L., CARDOSO E. M., TUMILASCI O., et al. (2008). Diagnostic value of salivary cortisol in end stage renal disease. *Steroids*, 73(1):77–82. [PubMed: 17945323].
- (8). BA I. (1986). Contribution à l’étude du syndrome néphrotique dans le service de néphrologie de l’hôpital national du Point G. Thèse Med, Bamako.
- (9). BANDHAKAVI S., STONE M. D., ONSONGO G., et al. (2009). A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *J Proteome Res*, 8:5590–600.
- (10). BELCHER J. M., EDELSTEIN C. L., PARIKH C. R. (2011). Clinical applications of biomarkers for acute kidney injury. *Am J Kidney Dis*, 57:930–40.
- (11). BELLIN M. F. Serv. Imagerie Médicale – Hôpital P. Brousse – Villejuif Echo anatomie du rein et des voies excrétrices supérieures.
- (12). BEN-ARYEH H., SHALEV A., SZARGEL R., LAOR A., LAUFER D., GUTMAN D. (1986). The salivary flow rate and composition of whole and parotid resting and stimulated saliva in young and old healthy subjects. *Biochem Med Metab Biol*, 36:260-65.
- (13). BLESSUM C., JEPPSSON J. O., AGUZZI F., BERNON H., BIENVENU J. (1999). Capillary electrophoresis: principles and practice in clinical laboratory. *Ann Biol Clin (Paris)*, 57:643–57.
- (14). BLICHARZ T. M., RISSIN D. M., BOWDEN M., et al. (2008). Use of colorimetric test strips for monitoring the effect of hemodialysis on salivary nitrite and uric acid in patients with end-stage renal disease: a proof of principle. *Clin Chem*, 54(9):1473–1480. [PubMed: 18676588]

- (15). **BODMER M., HASCHKEB M., DICKENMANN M. L. (2013).** Les médicaments dans l'insuffisance rénale. *Forum Med Suisse*, 13(4):64–69.
- (16). **BOUBCHIR M. A. (2002).** Abrégé de néphrologie. 1^{ère} édition ELAMEL Tizi-Ouzou.
- (17). **BRADLEY R. M. (1991).** Salivary secretion. In : Getchell TV ed. Smell and taste in health and disease. *Raven Press*.
- (18). **BREYER M. D., BADR K. F. (1995).** Arachidonic acid metabolites and the kidney. In: Brenner B. M. eds. The kidney. Philadelphia: *WB Saunders*, p 754-788.
- (19). **CHRISTIAN J. (1992).** Syndromes glomérulaires. In : Fries D., Druet P., Fournier A., Paillard M., editors. Maladies rénales. Paris : *Hermann*, p 47-53.
- (20). Collège universitaire des enseignants de néphrologie (CUEN). Insuffisance rénale aiguë 2010; 22 :1-22.
- (21). **DADOUNE J. P., HADJISKY P., SIFFROI J. P. (2000).** Histologie. 2e ed. Paris: *Médecine -science Flammarion*, 191-193.
- (22). **D'AMICO G., BAZZI C. (2003).** Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12: 639–43.
- (23). **DANIEL T. (1992).** Peptide growth factors and the kidney. In: Seldin D. W., Giebisch G. eds. The kidney: physiology and pathophysiology. New York: *Raven Press*, 3135-3155.
- (24). **DECRAMER S., GONZALEZ DE PEREDO A., BREUIL B., MISCHAK H., MONSARRAT B., BASCANDS J. L., et al. (2008).** Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1850-62.
- (25). **DELMAS V., BENOIT G. (1989).** Anatomie du rein et de l'uretère. *ENCYCL. MED. CHIR.* (Paris, France). Rein, 18001 CIO, P12-24.
- (26). **DEVOIZE L., DALLEL R. (2010).** Salivation. *Encycl Méd Chir Médecine buccale*, 28-150-M-10.
- (27). **DIALLO K. W. (2000).** Néphropathie glomérulaire à la pédiatrie de l'HGT. Thèse de Méd Bamako.
- (28). **DODDS M. W., DODDS A. P. (1997).** Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 83 : 465-70.
- (29). **DUTTA S. K., ORESTES M., VENGULEKUR S., KWO P. (1992).** Ethanol and human saliva : effect of chronic alcoholism on flow rate, composition, and epidermal growth factor. *Am J Gastroenterol*, 87: 350-4.
- (30). **EMEIGH HART S. G. (2005).** Assessment of renal injury in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 52: 30–45.

- (31). **FOURCADE J. (2006)**. Néphrologie: insuffisance rénale aiguë. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, p 2.
- (32). **FOURCADE J. (2006)**. Néphrologie: syndrome néphrotique de l'adulte. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, p 1-13.
- (33). **FRANCIS W. G. (2006)**. Physiologie médicale. 2 ed. Bruxelles : de Boeck, p 848.
- (34). **FREDERICQ L. (1885)**. Elements De Physiologie Humaine. *Print Book Paris*, p 369.
- (35). **FRIMAT L., LOOS-AYAV C., BRIANÇON S., KESSLER M. (2005)**. Épidémiologie des maladies rénales chroniques. EMC (Elsevier SAS, Paris). *Néphrologie*, 18-025-A-10.
- (36). **FURNESS P. N., HARRIS K. (1994)**. An evaluation of experimental models of glomerulonephritis. *Int J Exp Pathol*, 75: 9–22.
- (37). **GHFIR I., BEN RAÏS N. (2013)**. Anatomie et physiologie de l'appareil urinaire.
- (38). **GOUGOUX A. (2005)**. Physiologie des reins et des liquides corporels. Québec Multimondes.
- (39). **GRANGER D. A., SHIRTCLIFF E. A., BOOTH A., KIVLIGHAN K. T., SCHWARTZ E.B. (2004)**. The « trouble » with salivary testosterone. *Psychoneur endocrinology*, 20 : 1229-40.
- (40). **GUEGUEN Y., ROUAS C., LEBLOND F. A. (2012)**. Les biomarqueurs d'atteinte rénale. *Néphrologie & Thérapeutique*, 8 : 146 –155.
- (41). **GUNNING M. E. INGELFINGER J. R., KING A. J., BRENNER B. M. (1995)**. Vasoactive peptides and the kidney. In: Brenner BM ed. *The Kidney*. Philadelphia: *WB Saunders*, 627-712.
- (42). **HAMBURGER J. (2003)**. Le syndrome néphrotique. *Revue du praticien. Tome 50*, 1807-1816.
- (43). **HANNEDOUCHE T. (1999)**. Glomérulonéphrite extramembraneuse.
- (44). **HARDT M., THOMAS L. R., DIXON S. E., NEWPORT G., AGABIAN N., PRAKOBPHOL A., ET AL. (2005)**. Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry*, 44: 2885– 99.
- (45). Haute Autorité de Santé/Service évaluation des actes professionnels/Évaluation du débit de filtration glomérulaire, et du dosage de la créatininémie dans le diagnostic de la maladie rénale chronique, chez l'adulte décembre 2011 ; p : 14-22.
- (46). **HIRTZ C., et al. (2004)**. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics Sous Presse*.

- (47). **HIRTZ C., CHEVALIER F., RAINGEARD I., EGEA J.C., BRINGER J., ROSSIGNOL M., DEVILLE DE PERIERE D. (2005).** Recherche préliminaire de marqueurs salivaires du diabète de type 1 chez l'homme. *Les cahiers de l'ADF*, N°18-19- 1^{er} trimestre.
- (48). **HUMPHREY S. P., WILLIAMSON R.T. (2001).** A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*, 85:162-169.
- (49). **HUQ N.L., CROSS K.J., UNG M., MYROFORIDIS H., VEITH P.D., CHEN D., et al. (2007).** A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *Int J Pept Res Ther*, 13: 547-64.
- (50). **KAMINA P., DI MARINO V. (1993).** Appareil digestif et rein. Ed Maloine. *Abdomen Tom 2*.
- (51). **KAUFMAN E., LAMSTER I. B. (2002).**The diagnostic applications of saliva: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13:197–212.
- (52). **KONE S. (1996).** Syndrome néphrotique de l'enfant condition de découverte et de prise en Charge dans les deux hôpitaux nationaux de Bamako Point G. HGT. Thèse de Méd. Bamako N56.
- (53). **KONRAD D. C. (1972).** Tables scientifiques. 7^{ème} édition. P 672.
- (54). **LAEMMLI U. K. (1970).** Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 :680-685.
- (55). **LAUDENBACH P. (1987).** Glandes salivaires: notions fondamentales et exploration des glandes salivaires. *Encycl Méd Chir (Paris)*. Odontologie, 22057A10, a, 7.
- (56). **LE BRICON T. (2002).** Identification et dosage des protéines urinaires au laboratoire d'analyses. *Ann Biol Clin*, 60/5 : 525-540.
- (57). **LE HIR M., BESSE E.V. (2003).** Novel mechanism of nephron loss in a murine model of crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*, 63: 591-99.
- (58). **LEVEY A.S., CORESH J., BALK E., KAUSZ A. T., LEVIN A., STEFFES M. W., et al. (2003).** National Kidney Foundation. National practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med*, 139:137–47.
- (59). **LIANO F., PASCUAL J. (1996).** Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int*, 50:811-8.
- (60). **LIPPINCOTT W. W., (2009).** Atlas of Anatomy. 1st Edition.
- (61). **LLOYD J.E., BROUGHTON A., SELBY C. (1996).** Salivary creatinine assays as a potential screen for renal disease. *Ann Clin Biochem*, 33: 428-431.

- (62). **LOTY S., LOT Y. C., HUE O. (1998).** Les substituts salivaires. *Cah Prothèse*, 101:19-26.
- (63). **MACHER M. (2004).** Insuffisance rénale aiguë chez l'enfant. *EMC Pédiatrie*, 73-88.
- (64). **MANALICH R., REYES L., HERAERA M., et al. (2000).** Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans : a histomorphometric study. *Kdeny Int*, 58 : 770-773.
- (65). **MANDEL I. D. (1980).** Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 12:321-66.
- (66). **MARIEB E. N. (2005).** Anatomie et physiologie humaine. 6^e ed. Pearson éducation. p1024-1050.
- (67). **MARIEB E. N. (2008).** Biologie humaine principes d'anatomie et de physiologie. 8^e ed. Pearson éducation, p 415.
- (68). **MELLAL A. (2010).** Application pratique de l'anatomie humaine Tome 1-viscères du tronc. 1^{ère} édition publiobook paris- France, P 210-218.
- (69). **OBBERG S. G., IZUTSU K.T., TRUELOVE E.L. (1982).** Human parotid saliva protein composition: dependence on physiological factors. *Am J Physiol*, 242: 231-6.
- (70). **ODMAN M. L. (2005).** Influence de l'alimentation dans l'émergence de la lithiase salivaire. Université de Genève.
- (71). **PALLOT J. L. (2007).** Physiologie rénale. *Ifits*, 28: 1-28.
- (72). **PANG L.Y., ARGYLE D. (2010).** Cancer stem cells and telomerase as potential biomarkers in veterinary oncology. *Vet J*, **185**:15–22.
- (73). **PARIKH C. R., DEVARAJAN P. (2008).** New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med*, 36: S159–65.
- (74). **PATRICE C.** Atlas de pathologie rénale, P 27
- (75). **PEDERSEN A. M., BARDOW A., JENSEN S. B. and NAUNTOFTE B. (2002).** Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8: 117-129.
- (76). **PELLAT B. (2010).** Salives et milieu buccal. *Encycl Med Chir Médecine Buccale*, [28-150-H-10]
- (77). **PFAFFE T., COOPER-WHITE J., BEYERLEIN P., KOSTNER K. and PUNYADEERA C. (2011).** Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clinical Chemistry*, 57:5, 675–687, p 678.

- (78). **PIGNEL R., BEDOUET A. (2008).** BILAN BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE (examens de laboratoire).
- (79). **PISANO E., CABRAS T., MONTALDO C., PIRAS V., INZITARI R., OLMI C., CASTAGNOLA M. and MESSANA I. (2005).** Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESIMS. *European Journal of Oral Sciences*, 113: 462-468.
- (80). **POLLOCK J. J., GOODMAN BICKER G., KATONA L., CHO M. I., LACONO V. J. (1979).** Lysozyme bacteriolysis. In: Kleinberg I., Ellison S. A., Mandel I. D. editors. *Saliva and dental caries. Washington, DC: Information Retrieval*, p 429-47.
- (81). **ROAMANETTO J. (2011).** Interets des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. Thèse de docteur en pharmacie. *Nancy : Université de Nancy*, p 121.
- (82). **SAPRIEL M., STOLTZ P. (2006).** Une introduction à la médecine traditionnelle chinoise : le corps théorique. Paris; Berlin Heidelberg New York Hong Kong Londres Milan Tokyo : springer.
- (83). **SCHAIFFLER A., MENCHE N. (2004).** Anatomie physiologie biologie. 2 édition maloine. système urinaire équilibre hydro-électrique, p 364-381.
- (84). **SCHERBERICH J. E. (1990).** Urinary proteins of tubular origin: basic immunochemical and clinical aspects. *Am J Nephrol*, 10(Suppl. 1): 43-51.
- (85). **SCHIPPER R.G., SILLETTI E., VINGERHOEDS M. H. (2007).** Saliva as researchmaterial: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol*, 52: 1114-35.
- (86). **SCHNERMANN J., BRIGGS J. P. (1992).** Function of the juxtaglomerular apparatus. Control of glomerular hemodynamics and renin secretion. In: Seldin D. W., Giebisch G. eds. *The kidney: physiology and pathophysiology. New York: Raven Press*, 1249-1289.
- (87). **SHEMESH O., GOLBETZ H., KRISS J. P., MYERS B.D. (1985).** Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int*, 28: 830-8.
- (88). **SINGH N. K., SHEPHERD K. W., CORNISH G. B. (1991).** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of cereal science*, 14: 203-208.
- (89). **SZYMANOWICZ A., NEYRON M.J., DENIS I. (2006).** Proposition de textes interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines urinaires. *Spectra Biol*, No 155: 41-51.
- (90). **TORTORA D. (2007).** Principes d'anatomie et de physiologie. 4ème édition de renouveau pédagogique, P 1076-1077.
- (91). **TOURNOIS-HIRZEL C., CANIVET E.** Marqueurs de l'insuffisance rénale et prise en charge des patients en insuffisance rénale chronique, dialysés et transplantés. In : Biochimie

Médicale - Marqueurs actuels et perspectives, 2 édition (2012). Beaudoux J. L. et Durand G. coordonnateurs. Editions Médecine Sciences Lavoisier, chap. 19, p 343-74.

(92). VERONIQUE-KAIRAVA., BILODEAU D. O. (2007). Insuffisance rénale, p 1.

(93). VIDAILHET B., ROBIN O., POLO A., BRAVETTI P., MAHLER P. (2008). Salivation [en ligne]. In : EMC (Elsevier Masson SAS) *Médecine buccale*, 28-150-M-10.

(94). WALT D. R., BLICHARZ T. M., HAYMAN R. B., et al. (2007). Microsensor arrays for saliva diagnostics. *Ann N. Y. Acad Sci*, 1098: 389–400. [PubMed: 17435144]

(95). WESTHUYZEN J., ENDRE Z. H., REECE G., REITH D. M., SALTISI D., MORGAN T. J. (2003). Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant*, 18: 543–51.

(96). YANG FOO J.Y., WAN Y., KOSTNER K., et al. NT-Pro BNP levels in saliva and its clinical relevance to heart failure. [Epub] *PLoS One* October 31, 2012 as doi:10.1371/journal.pone.0048452.

(97). <http://fr.wikipedia.org/wiki/>.

(98). [http://www.soc Néphrologie.Org/SNP/index.html](http://www.socNéphrologie.Org/SNP/index.html)

(99). <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/urine/16815>

(100). <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/>



Annexes



Questionnaires

Nom : Sexe : F H

Région :

Prénom : Age : ans

1. Etes-vous fumeur ? **Oui** **Non**

2. Etes-vous diabétique ? **Oui** **Non**

3. Etes-vous hypertendu(e) ? **Oui** **Non**

4. Avez-vous une élévation du cholestérol ? **Oui** **Non**

5. Existe-t-il dans votre famille des maladies rénales ou du diabète ou HTA ? **Oui** **Non**

6. Dois---tu prendre des médicaments ? **Oui** **Non**

7. Si oui, à quelle fréquence journalière dois---tu prendre tes médicaments ?

1 fois par jour 2 fois par jours 3 fois par jours Plus de 3 fois par jour

8. Avez-vous eu des infections urinaires hautes récidivantes **Oui** **Non**
(accompagnées de fièvre) ou du sang dans vos urines ?

9. Avez-vous d'autres maladies ? **Oui** **Non**

Si oui, lesquelles ?

Annexe 2

Liste des patients (sexe, âge, wilaya, la maladie, taille des reins, protéinurie)

Patient	Sexe	Age	Origine	La maladie	La taille des reins	Protéinurie g/L
1	H	40 ans	Oum el bouaghi	SN	↗	0,5
2	H	27	Constantine	SN	N	1,53
3	F	63	Sétif	SN	N	6,2
4	F	32	Jijel	SN + TRC	↘	0,7
5	F	54	Mila	SN + IRA	N	7,8
6	F	35	Oum el bouaghi	SN	N	/
7	H	20	Mila	SN	N	10,5
8	H	32	Constantine	SN + IRA	N	5,9
9	F	40	Constantine	NTA	N	0,20
10	H	49	Constantine	IRC	10	1
11	F	53	Constantine	NTA	N	0,34
12	F	28	Mila	Néphropathie lupique	N	7,5
13	F	30	Constantine	IRA	N	0,15
14	H	45	Mila	SN	N	3,4
15	F	81	Mila	IRC	↘	/
16	F	52	Constantine	IRC	N	1
17	F	59	Oum el bouaghi	SN	↗	8,6
18	F	64	Constantine	IRA sur IRC	↘	0,15

Composition des gels d'électrophorèse

Gel de séparation : T : 12,52% C : 0,97%

- Acrylamide 40% 12,4ml
- Bis acrylamide 2% 2,4 ml
- Eau permutée 8,6 ml
- Tampon Tris-HCL pH 8,8 15,2ml
- SDS 10% 0,40 ml
- APS 1% 1 ml
- TEMED 0,020 ml

Gel de concentration : T : 2,88% C : 1,42%

- Acrylamide 40% 1ml
- Bis acrylamide 2% 0,3 ml
- Eau permutée 10,2 ml
- Tampon Tris-HCL pH 8,8 1,7 ml
- SDS 10% 0,14 ml
- APS 1% 0,70 ml
- TEMED 0,014 ml

Résumé

La maladie rénale est un problème majeur de santé publique. Pour cela, des avancées significatives dans la recherche de nouveaux biomarqueurs protéiques sont nécessaires afin de réaliser un diagnostic précoce et spécifique. Plus récemment les marqueurs biologiques salivaires ont montré leur intérêt dans le diagnostic des maladies.

Afin de détecter un biomarqueur salivaire et/ou urinaire de cette pathologie, nous avons comparé les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des protéines salivaires et urinaires de sujet sain et de patients atteints de la maladie extraites dans deux conditions différentes.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 24 bandes protéiques salivaires et 39 bandes protéiques urinaires dans la condition dénaturante réductrice, 30 bandes protéiques salivaires et 48 bandes protéiques urinaires dans la condition dénaturante non réductrice.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence environ 20 bandes protéiques présentant des variations qualitatives et quantitatives d'expression dans le milieu salivaire (D1, D2, D3, D4 et D5 dans les conditions dénaturantes réductrices et D*, D**, D***, D**** et D***** dans les conditions dénaturantes non réductrices) et dans le milieu urinaire (U1, U2, U3, U4 et U5 dans les conditions dénaturantes réductrices et U', U'', U''', U'''' et U''''' dans conditions dénaturantes non réductrices).

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires et urinaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité et également en établissant une classification hiérarchique des patients selon la composition des protéines salivaires et urinaires.

Ces résultats préliminaires de mise en évidence de protéines salivaires et urinaires spécifiques et ou variantes au cours des pathologies rénales susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée, ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies. Toutefois, aucun de ces marqueurs ne peut être proposé pour une utilisation routinière en pratique clinique à ce jour mais des études complémentaires sur le protéome urinaire et salivaire sont nécessaires pour valider ces nouveaux biomarqueurs.

Mots clés : maladie rénale, biomarqueurs, salive, urine, électrophorèse, diagnostic.

Summary

Kidney disease is a major public health problem. For this, significant advances in the search for new biomarkers protein are necessary in order to achieve an early and specific diagnosis. More recently the salivary biomarkers have shown their interest in the diagnosis of diseases. To detect a biomarker of this pathology in saliva or urine, we compared the profiles obtained by one-dimensional electrophoresis of salivary and urinary proteins of healthy subjects and patients with the disease in two different conditions.

Analysis of gels allowed count 24 salivary protein bands and 39 urinary protein bands in the reductive denaturing condition, 30 salivary protein bands and 48 urinary protein bands in the non-reductive denaturing condition.

This study allowed us to identify approximately 20 protein bands with qualitative and quantitative expression variations in the salivary middle (D1, D2, D3, D4 and D5 in reducing denaturing conditions and D *, D *, D *, D * and D * in non-reducing denaturing conditions) and in the urinary environment (U1, U2, U3, U4 and U5 in reducing denaturing and U', U'', U''', U'''' and U''''' in non-reducing denaturing conditions).

To numerically assess the diversity of these salivary and urinary proteins, a statistical study was conducted by calculating frequencies, similarity index and also establishing a hierarchical classification of patients according to the composition of salivary and urinary proteins.

These preliminary results of salivary and urinary proteins highlighting specific and/or variants during renal pathologies that may be regarded as markers of studied pathology, open fields of new investigation both in the field of diagnosis and the monitoring of these pathologies. However, none of these markers can be proposed for routine use in clinical practice to date, but further studies on the urinary and salivary proteome are necessary to validate these new biomarkers.

Keywords: kidney disease, biomarkers, saliva, urine, electrophoresis, diagnosis.

الملخص

تعتبر أمراض الكلى من أهم الأمراض التي تهدد المجتمع و لهذا التقدم الحاصل في البحث عن مؤشرات حيوية بروتينية جديدة ضروري من اجل تشخيص مبكر و نوعي . حديثا المؤشرات البيولوجية اللعابية أظهرت أهميتها في تشخيص الأمراض من اجل رصد المؤشر اللعابي و البولي أو إحداهما لهذا المرض قمنا بمقارنة البيانات التي تحصلنا عليها بعد الهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد للبروتينات اللعابية و البولوية للأفراد الأصحاء والمرضى المستخرجة في شرطين مختلفين

تحليل المواد الهلامية مكننا من تعداد 24 شريط بروتيني لعابي و 39 شريط بروتيني بولي في شروط طبيعة مختزلة، 30 شريط بروتيني لعابي و 48 شريط بروتيني بولي في شروط طبيعة غير مختزلة هذه الدراسة مكنتنا من إبراز حوالي 20 شريط بروتيني أظهرت تغيرات نوعية وكمية في الوسط اللعابي تحصلنا على D1، D2، D3، D4، D5 (في شروط طبيعة مختزلة) * D، ** D، *** D، **** D و ***** D (شروط طبيعية) غير مختزلة) في الوسط البولي U1، U2، U3، U4، U5 (في شروط طبيعة مختزلة) U، U'، U''، U'''، U'''' و U'''''' (في شروط طبيعة غير مختزلة) .

لتقييم تنوع البروتينات اللعابية و البولوية عدديا، أجريت دراسة إحصائية عن طريق حساب ترددات، مؤشر التشابه، والتصنيف الهرمي للأفراد وفقا لتكوين البروتينات اللعابية و البولوية

هذه النتائج الأولية تبرز البروتينات اللعابية و البولوية المحددة أو المتغيرة أو كلاهما خلال الأمراض الكلوية والتي يمكن اعتبارها كمؤشر للمرض المدروس تفتح مجالات بحث جديدة في مجال التشخيص أكثر منه في مراقبة هذه الأمراض . ومع ذلك، فإنه لا يوجد أي مؤشر يمكن اقتراحه للاستخدام الروتيني في الممارسة العيادية حتى الآن، لكن هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات على بروتينوم البول و اللعاب للتحقق من صحة هذه المؤشرات الحيوية

الكلمات المفتاحية : أمراض الكلى، المؤشرات الحيوية، اللعاب، البول، الهجرة الكهربائية، التشخيص

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie
Option: Analyse Protéomique et Santé

Thème : Exploration du protéome salivaire et urinaire des patients atteints d'une maladie rénale par application des techniques d'électrophorèse

Résumé:

La maladie rénale est un problème majeur de santé publique. Pour cela, des avancées significatives dans la recherche de nouveaux biomarqueurs protéiques sont nécessaires afin de réaliser un diagnostic précoce et spécifique. Plus récemment les marqueurs biologiques salivaires ont montré leur intérêt dans le diagnostic des maladies.

Afin de détecter un biomarqueur salivaire et/ou urinaire de cette pathologie, nous avons comparé les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des protéines salivaires et urinaires de sujet sain et de patients atteints de la maladie extraites dans deux conditions différentes.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 24 bandes protéiques salivaires et 39 bandes protéiques urinaires dans la condition dénaturante réductrice, 30 bandes protéiques salivaires et 48 bandes protéiques urinaires dans la condition dénaturante non réductrice.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence environ 20 bandes protéiques présentant des variations qualitatives et quantitatives d'expression dans le milieu salivaire (D1, D2, D3, D4 et D5 dans les conditions dénaturantes réductrices et D*, D**, D***, D**** et D***** dans les conditions dénaturantes non réductrices) et dans le milieu urinaire (U1, U2, U3, U4 et U5 dans les conditions dénaturantes réductrices et U', U'', U''', U'''' et U''''' dans conditions dénaturantes non réductrices).

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires et urinaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité et également en établissant une classification hiérarchique des patients selon la composition des protéines salivaires et urinaires.

Ces résultats préliminaires de mise en évidence de protéines salivaires et urinaires spécifiques et ou variantes au cours des pathologies rénales susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée, ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies. Toutefois, aucun de ces marqueurs ne peut être proposé pour une utilisation routinière en pratique clinique à ce jour mais des études complémentaires sur le protéome urinaire et salivaire sont nécessaires pour valider ces nouveaux biomarqueurs.

Mots clés : maladie rénale, biomarqueurs, salive, urine, électrophorèse, diagnostic.

Devant le jury :

Président du jury : KHELIFI Douadi (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : BELLIL Inès (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

Examinatrice : BENHAMDI Asma (Maitre Assistante- UFM Constantine).

