

Que révèlent les urines? L'urine comme source d'information en physiopathologie

Mario Ollero, DVM, PhD
IMRB, Physiopathologie des
maladies glomérulaires

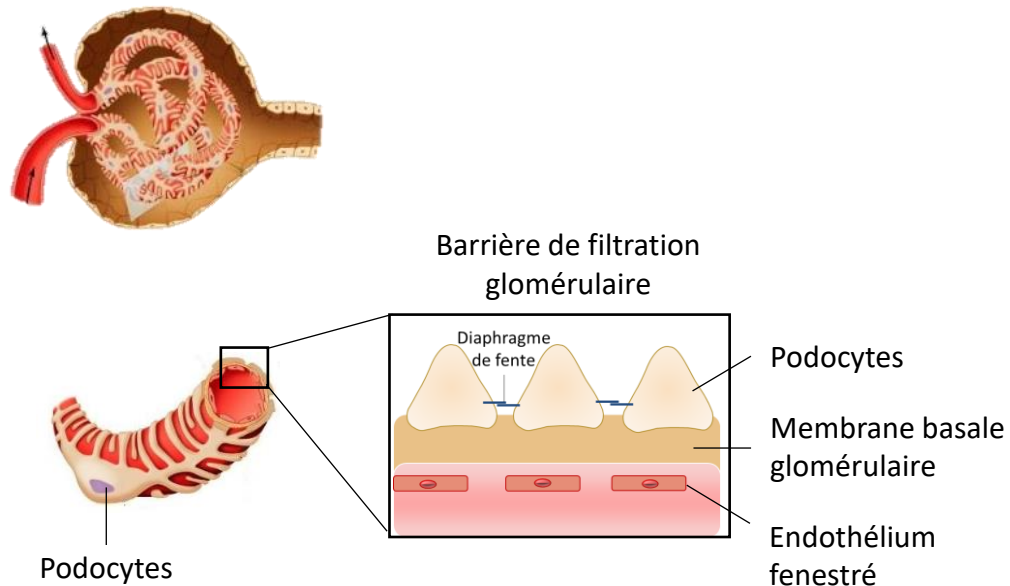


Overview

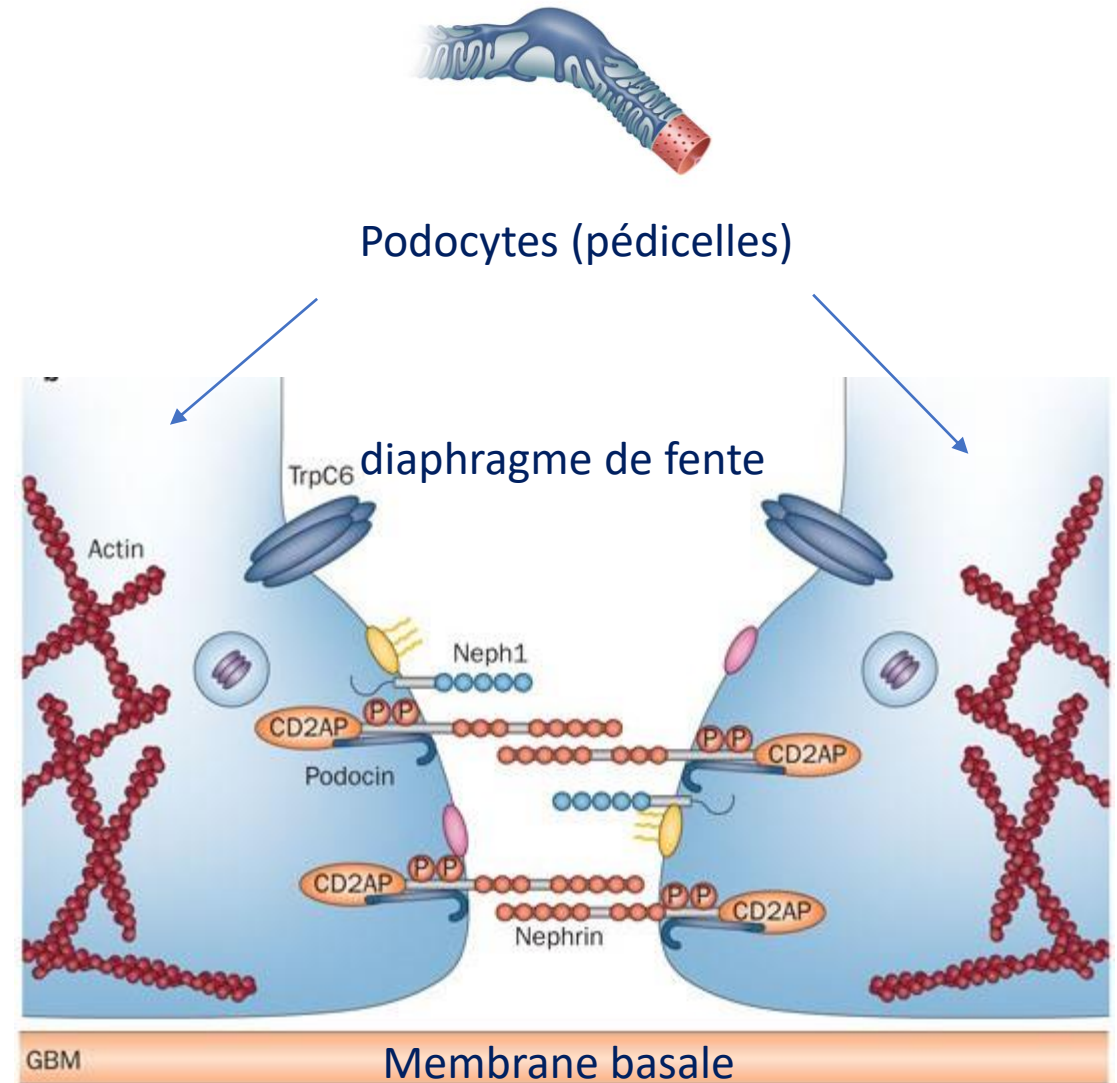
- Introduction: formation de l'urine, histoire
- Pourquoi chercher dans les urines?
- Comment aborder le problème?
- Exemples communs et exceptionnels
- Conclusion: les défis

Formation de l'urine: barrière de filtration glomérulaire

- Filtration: 180 litres de sang filtrés par jour
- 1 million de néphrons par rein
- Endothélium fenestré (70-100nm)
- Membrane basale glomérulaire
- Podocytes: diaphragme de fente (30-40nm)

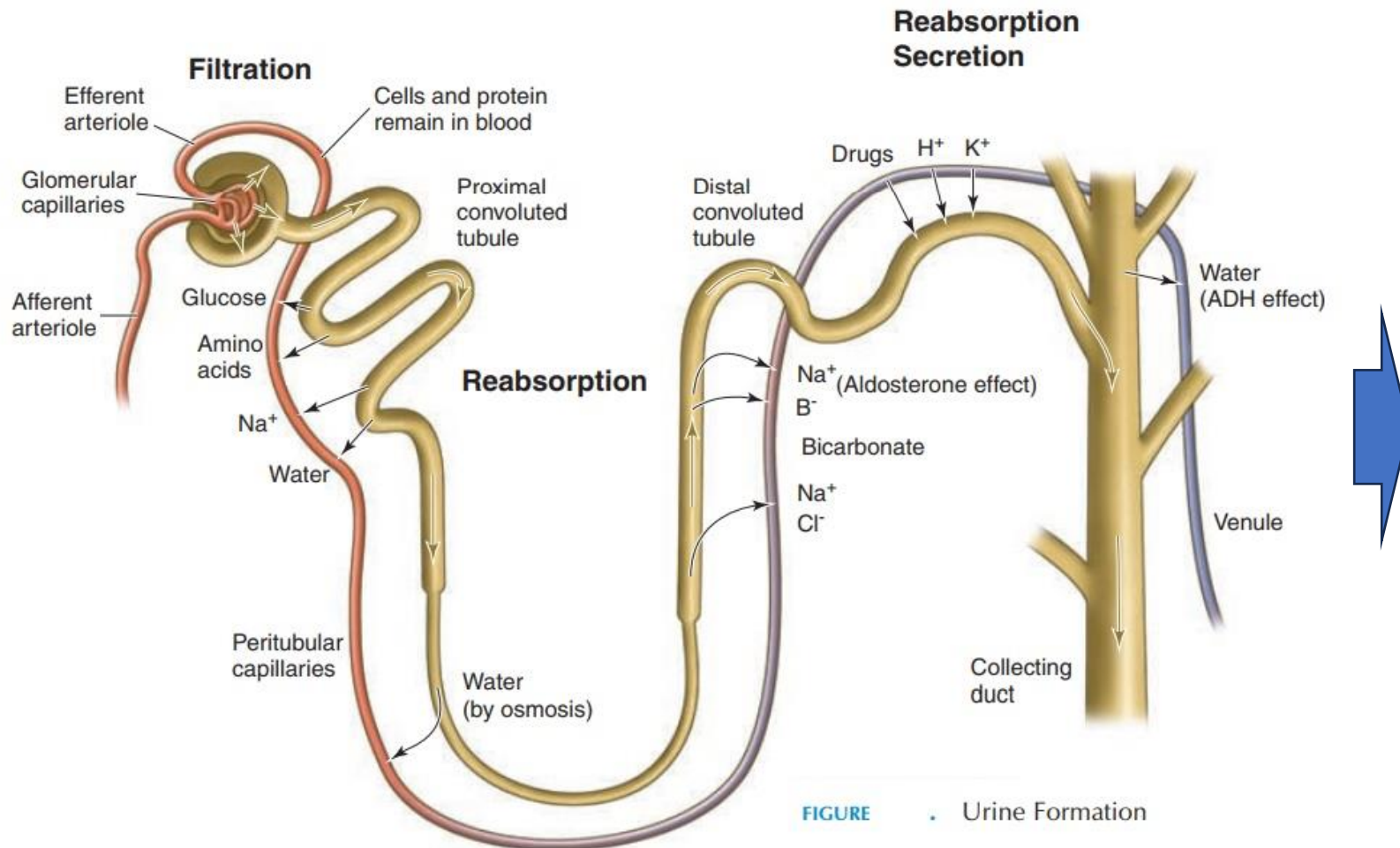


Cummings et al., 2006



Formation de l'urine: réabsorption, sécrétion

- Filtration, réabsorption, sécrétion



Composition

- 95% eau
- 2% Minéraux (K, Cl, Na, sulfates...)
- 2% urée
- 0.1% créatinine
- 0.03% acide urique
- Composés organiques: protéines, lipides, acides nucléiques
- Toxines
- Médicaments
- Produits dopants
- Drogues récréatives
- ...

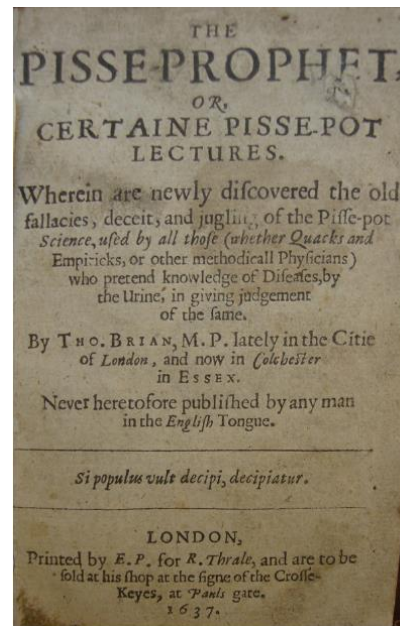
La recherche d'informations dans les urines: historique

- Egypte: couleur, odeur, gout, fourmis (glucosurie)
- Hippocrate : premier traité, test de la mousse
- Moyen âge: uroscopie
- XVI-XVIII: piss prophets
- XIX: Henry Bence-Jones (précipitation de protéine comme marqueur de cancer)
- XX-XXI: de l'urinalyse aux biomarqueurs

Glucosurie

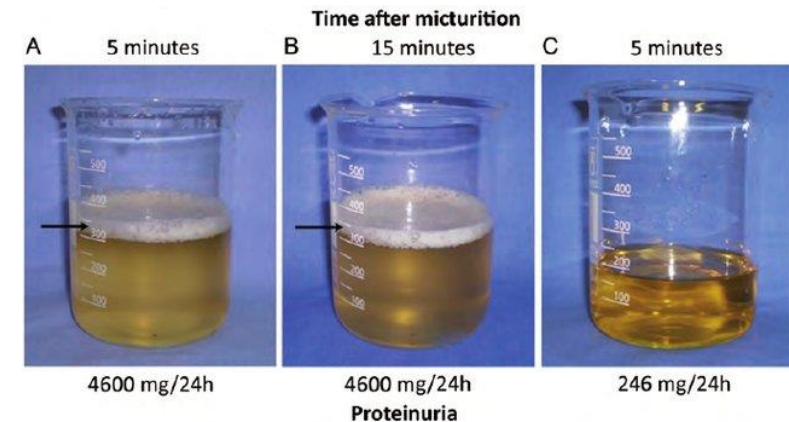


Uroscopy wheel



« The pisse Prophet »
Thomas Brian

Protéinurie (syndrome néphrotique): test de la mousse



https://www.researchgate.net/publication/275123441_Foamy_urine_in_nephrotic_syndrome

Pourquoi chercher dans les urines? Biomarqueurs: au-delà du test d'urine

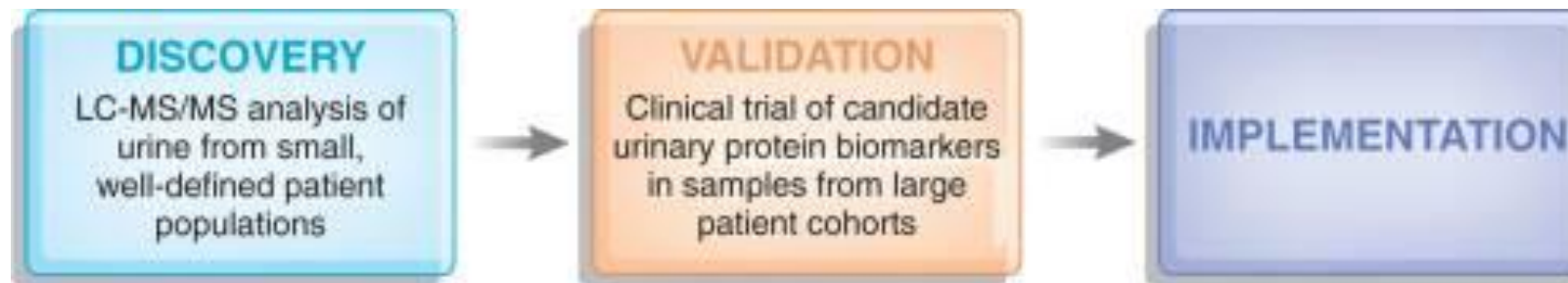
Biomarqueur (OMS): « toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré dans le corps humain ou les matrices biologiques susceptible d'influencer ou de prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie »

Diagnostiques
Pronostiques
Prédictifs



Stratification de patients: médecine personnalisée
Information sur physiopathologie

Etapes: découverte, validation, implémentation



Découverte: analyses à haut débit (omiques), signature moléculaire

Recherche de biomarqueurs: plasma vs. urine

Avantages de l'urine

- Prélèvement Simple et Non-Invasif
- Quantité presque illimitée
- Moins d'inconvénients par les donneurs
- Facile à stocker, manipuler, transporter
- Risque d'exposition réduit
- **Moins impactée par les mécanismes internes de régulation**
- **Monitorisation continue facile: suivi longitudinal**
- Abondance d'information biologique



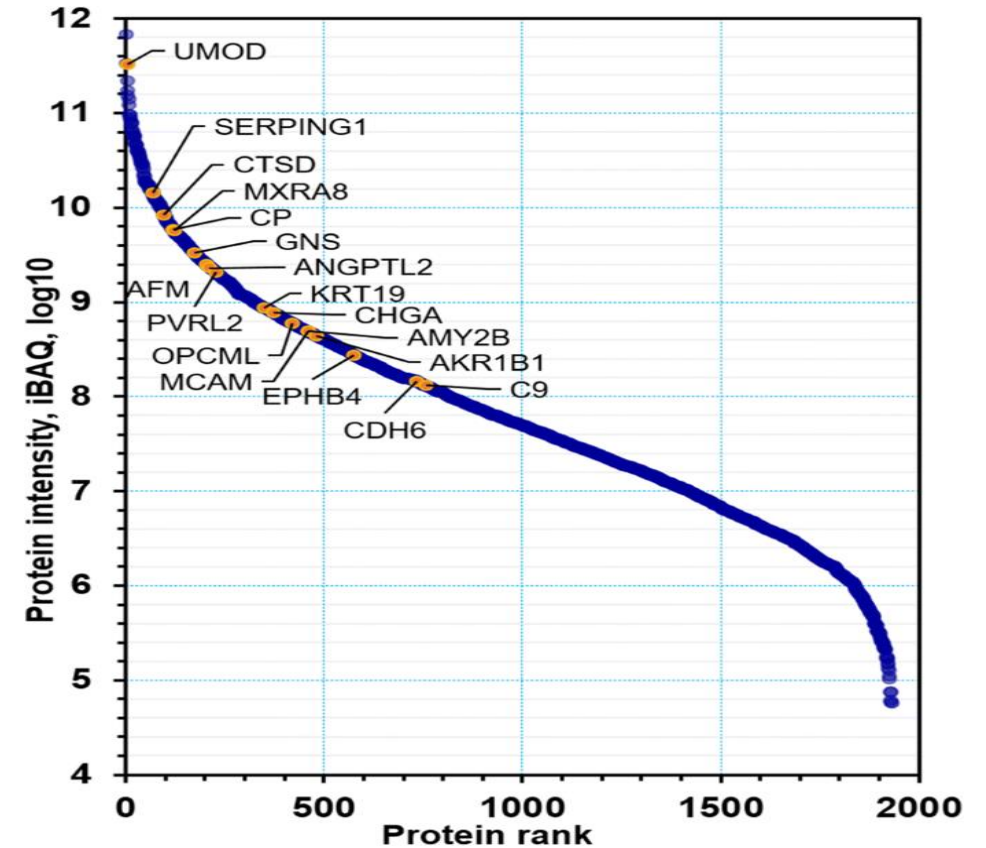
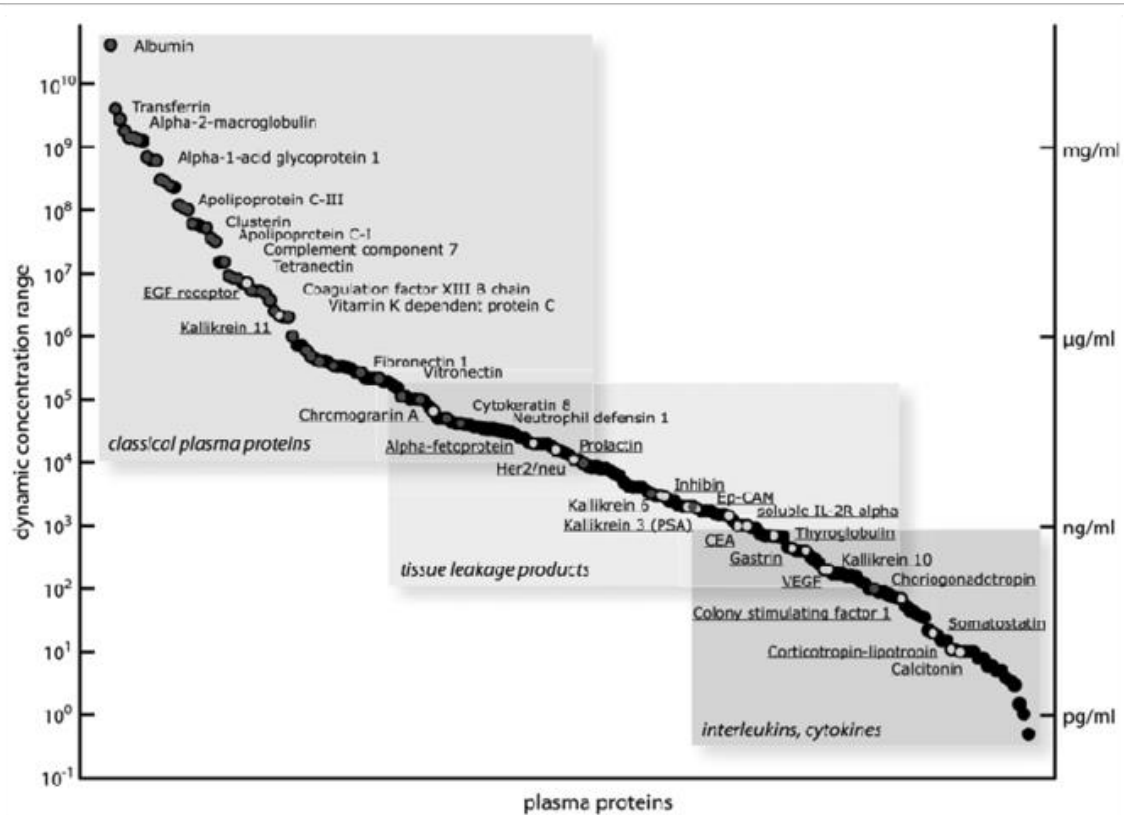
Zhang Z, Front. Anal. Sci. 1:812301.

Protéomique des urines

| A Urine Proteomics | | | | | | |
|---------------------------|----------|----------------------------|---|--|--------------------------------------|--|
| | 1D LC-MS | 2D LC-MS (Includes MDC) | SDS-PAGE (Includes SDS-PAGE + Lectin Enrichment) | GELFrEE and LP-IEF (Followed by 2D LC-MS) | Micro-vesicle and Exosome Enrichment | CPLL Bead Enrichment (including unbound) |
| Current Study | | 2193 | | | | |
| Adachi et al., 2006 | | | 1543 | | | |
| Li et al., 2010 | | 1310 | | | | |
| Marimuthu et al., 2011 | | | 1823 | | | |
| Nagaraj et al., 2011 | 808 | | | | | |
| Zerefos et al., 2012 | | | 588 | | | |
| Santucci et al., 2014 | | 1176 | | | 1615 | 1794 |
| Zhao et al., 2017 | 808 | 3162 | | 6085 | | |

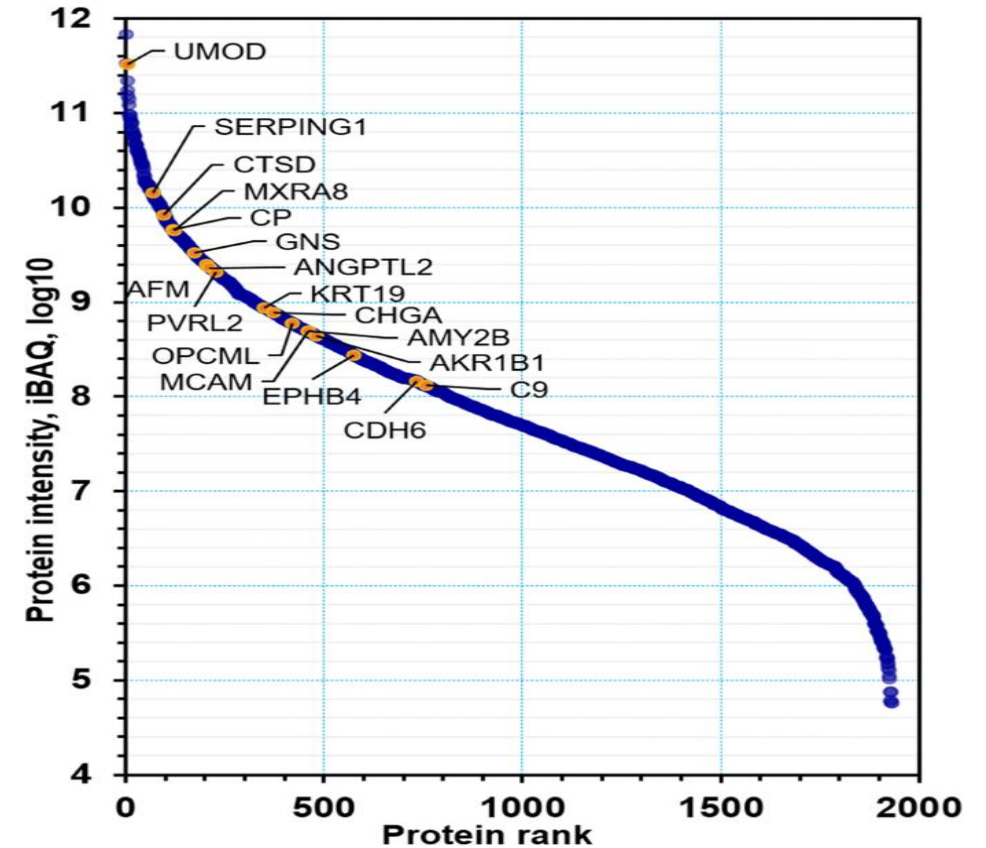
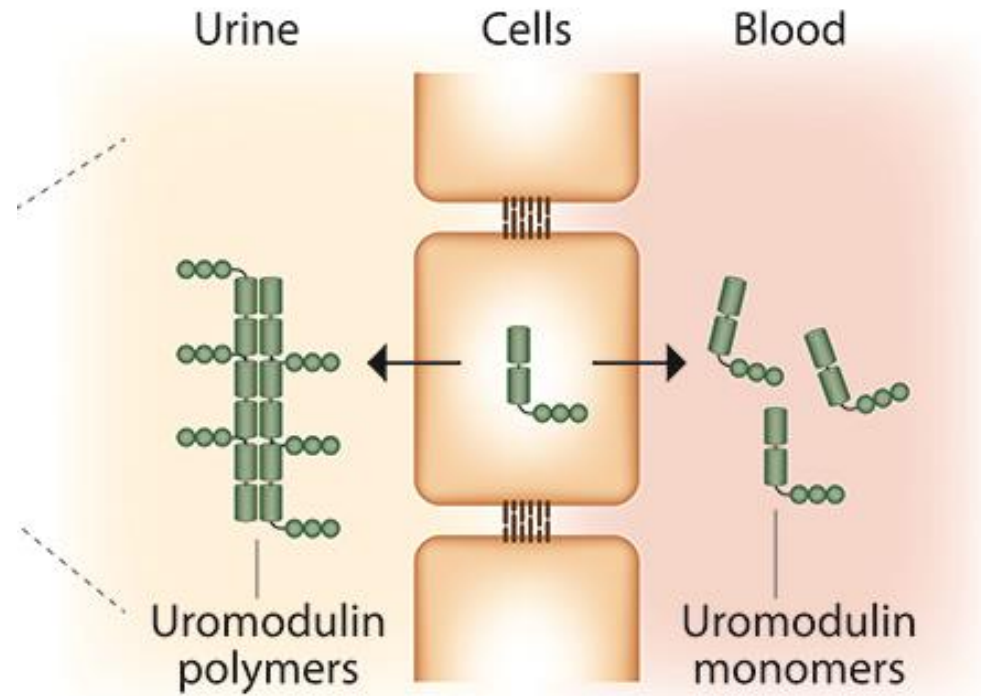
| B Urinary Proteomics in Disease | | | | | | |
|--|---|--------------|-------------------------------|--------------------|--|-----------------------------|
| | Acute Renal Rejection | Stable Graft | Chronic allograft nephropathy | BK virus nephritis | Acute Kidney Injury in preterm infants | Bladder cancer |
| Sigdel et al., 2016 | 958 proteins quantified; a panel of 35 peptide signatures for segregating patient groups. | | | | | |
| Chen et al., 2010 | | | | | | 638 proteins; 55 candidates |
| Jung et al., 2020 | | | | | 1,810 proteins; 5 validated | |

Protéomique: gamme dynamique plasma vs. urine



Gamme dynamique: rapport de la plus grande à la plus petite valeur d'une grandeur (abondance des protéines).
 Plasma: 12. Urine: 10 ordres de magnitude

Protéomique: gamme dynamique plasma vs. urine



Gamme dynamique: rapport de la plus grande à la plus petite valeur d'une grandeur (abondance des protéines).

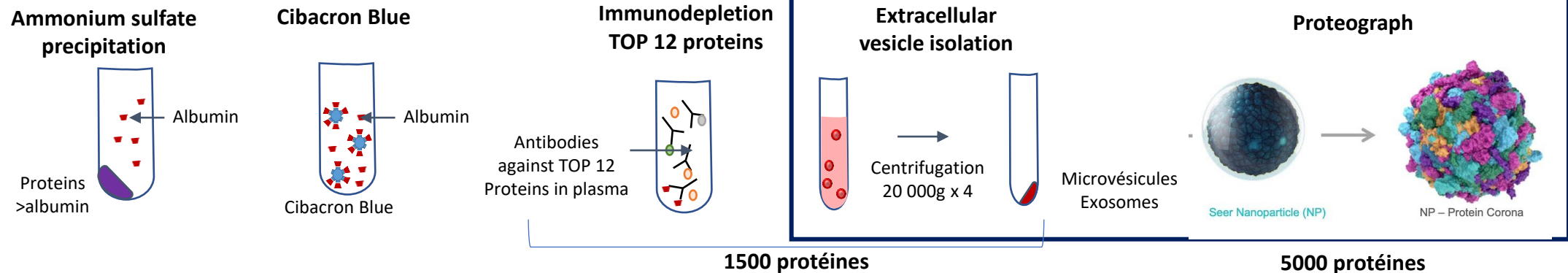
Plasma: 12. Urine: 10 ordres de magnitude

Uromodulin (UMOD, Tamm-Horsfall protein)

Réduire la gamme dynamique: exemple plasma

- Syndrome néphrotique idiopathique: protéinurie, hypoalbuminémie, dyslipidémie, edema
- Pathogenèse: facteurs circulants (protéine?...)
- Cours: rémission/rechute (15% patients)
- Formes sévères: dialyse et transplantation (50% des patients récidivent)
- Biomarqueurs prédictifs: risque de rechute, risque de récidence post-greffe

Protéomique du plasma: réduction de la gamme dynamique

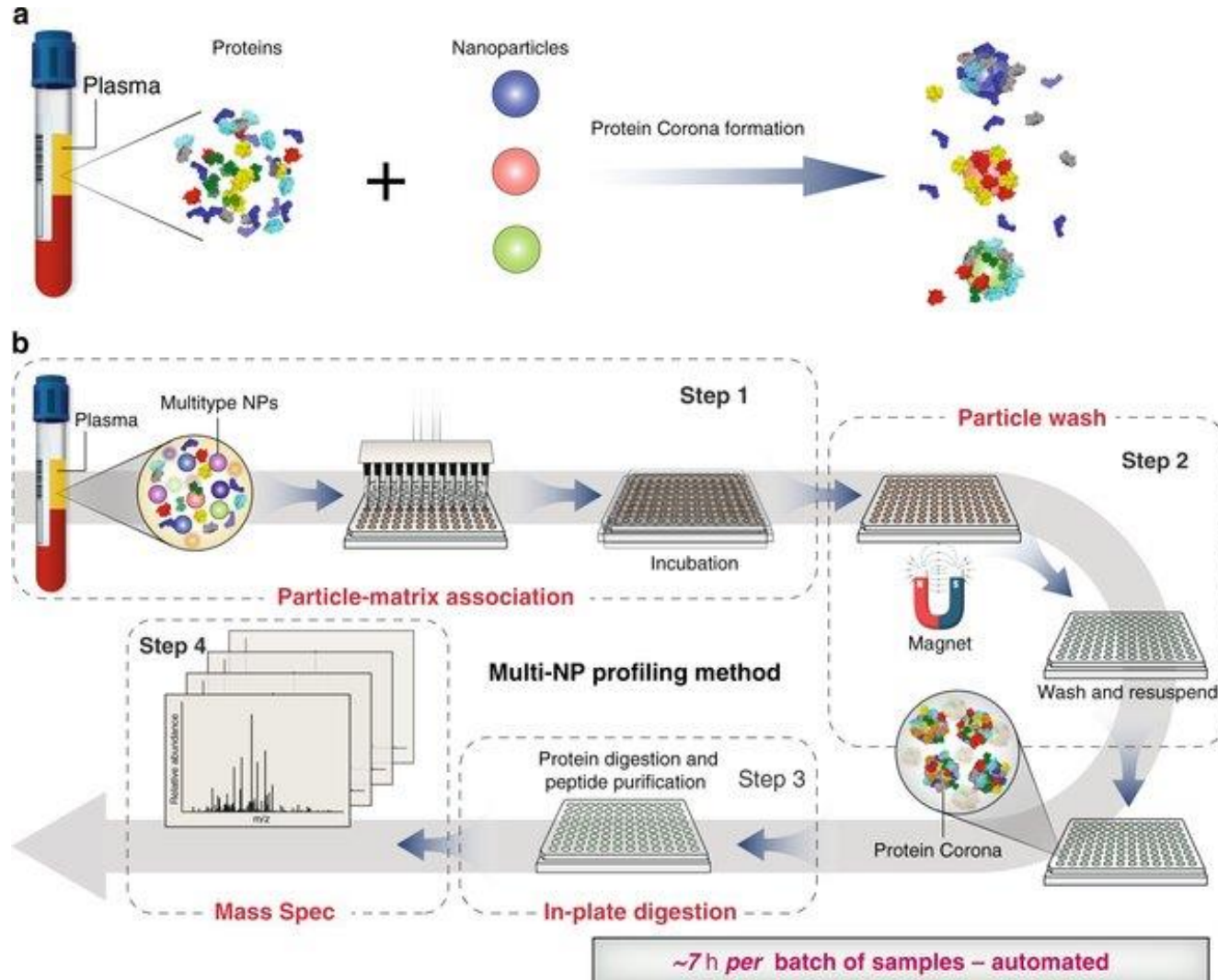


Chhuon C, et al. Int J Mol Sci. 2023 Jul 28;24(15):12124

Protéomique des urines: en cours

Réduire la gamme dynamique: exemple plasma

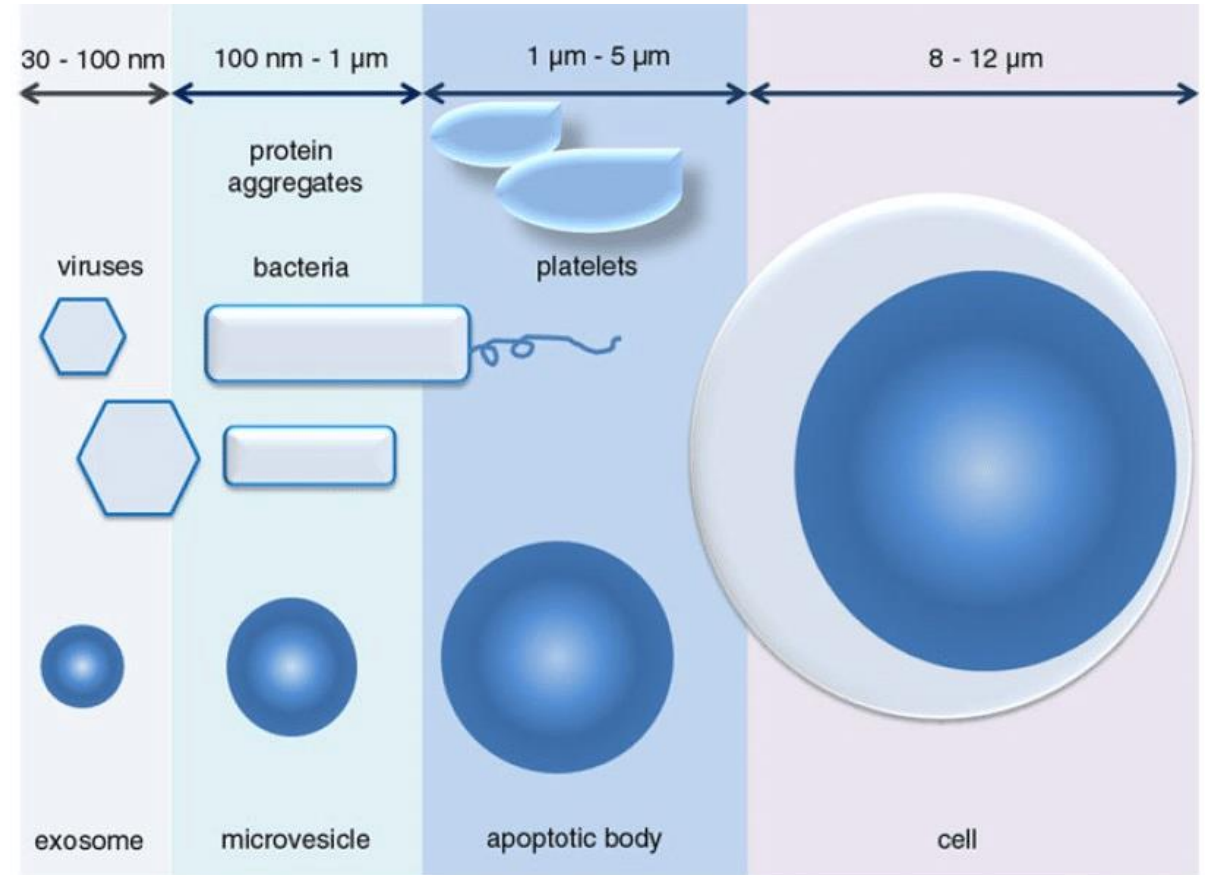
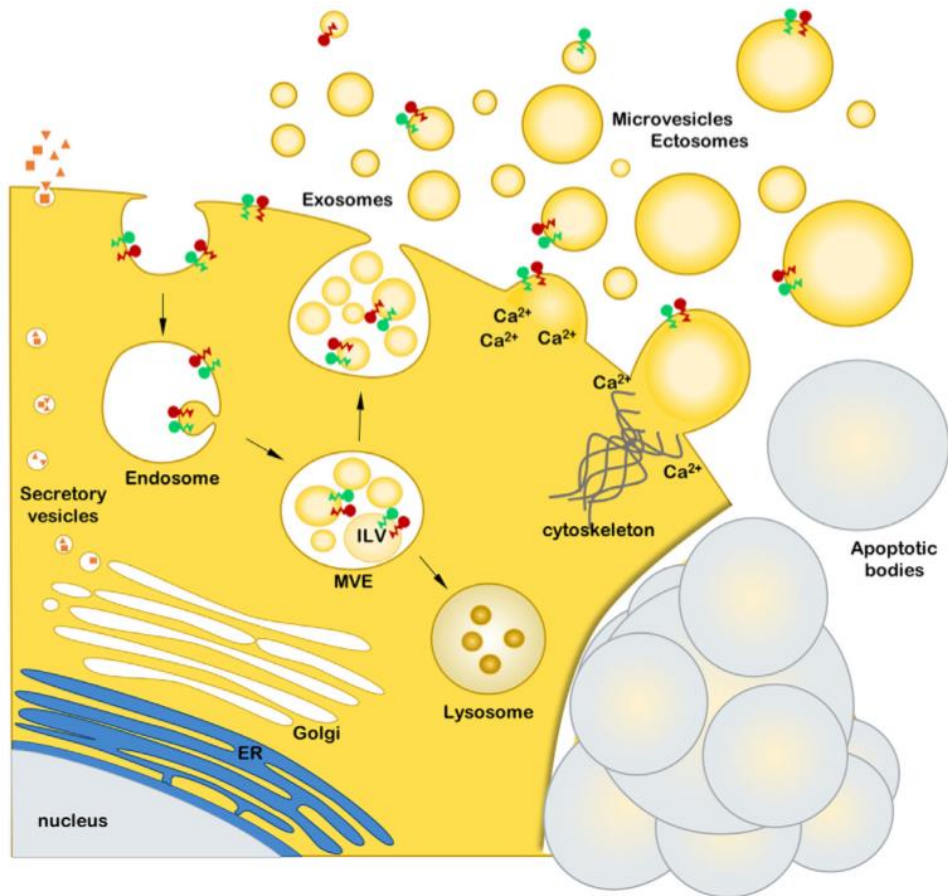
Proteograph™ (Seer/Necker Proteomics): nanoparticle protein corona



Vers la biopsie liquide: vésicules extracellulaires

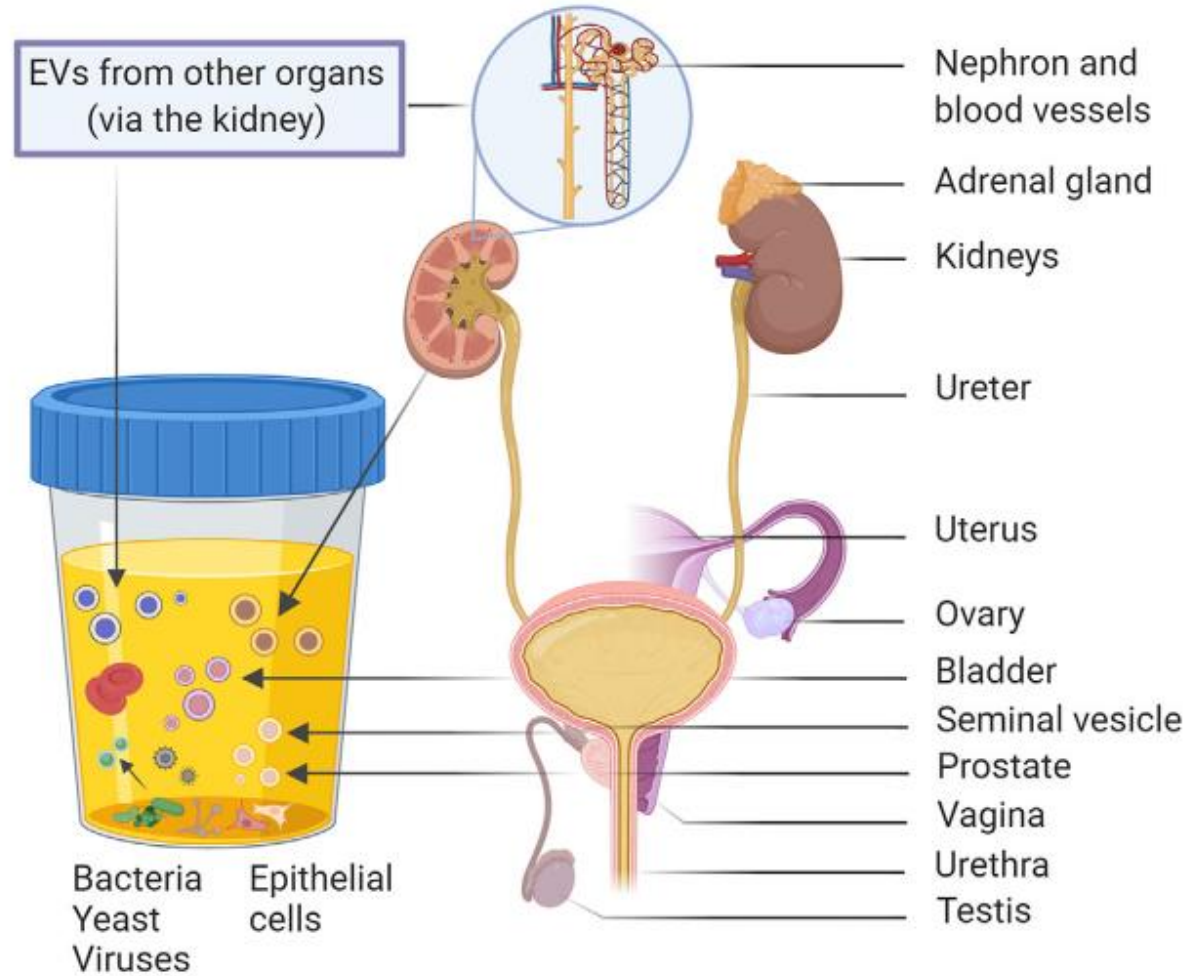
Présence dans l'urine

- Cellules système urogénital
- Transcytosis
- Diaphragme de fente endommagé



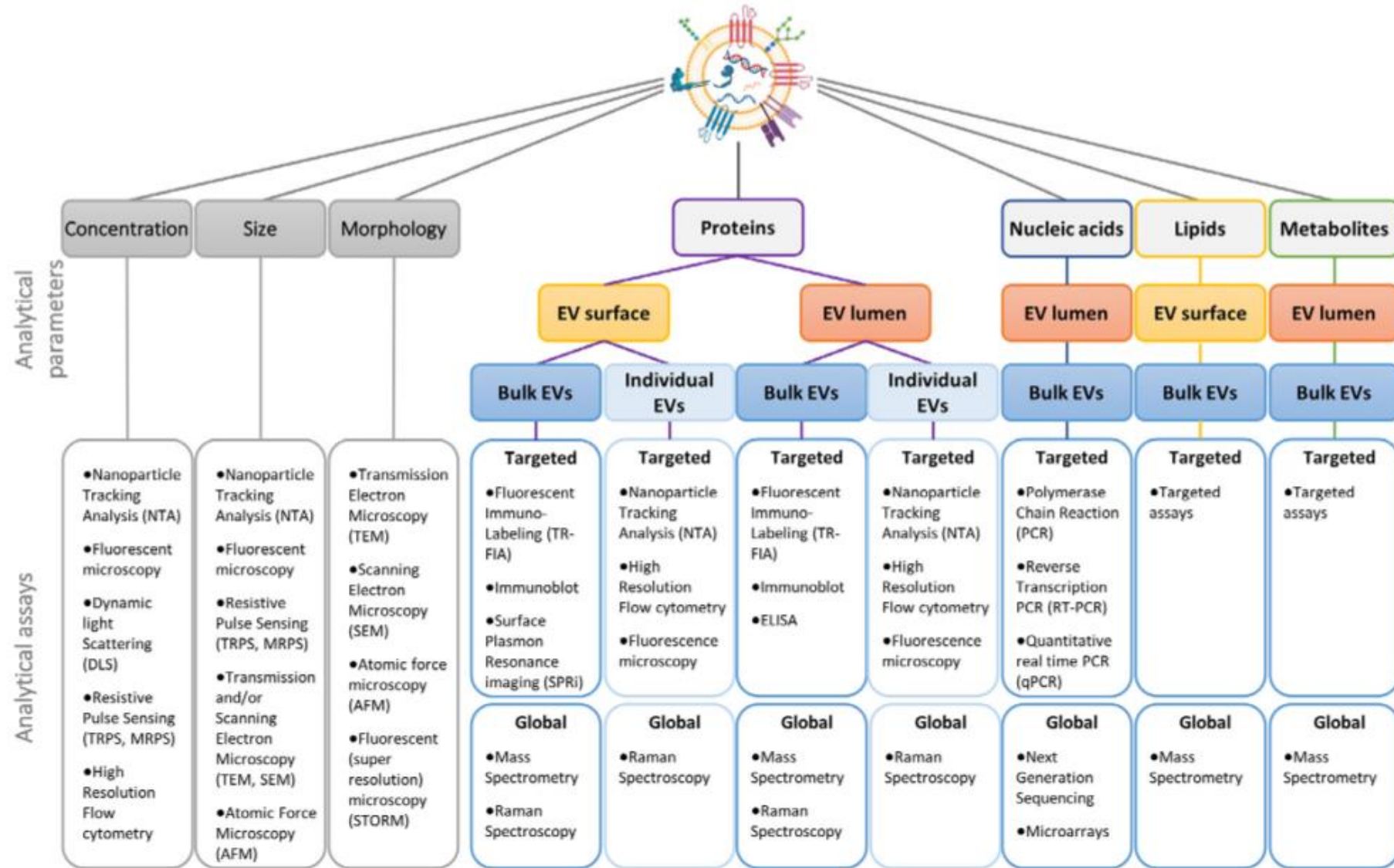
Erdbrügger, et al Extracellular Vesicles. J. Extracell. Vesicles, 10, e12093.

Vers la biopsie liquide: vésicules extracellulaires



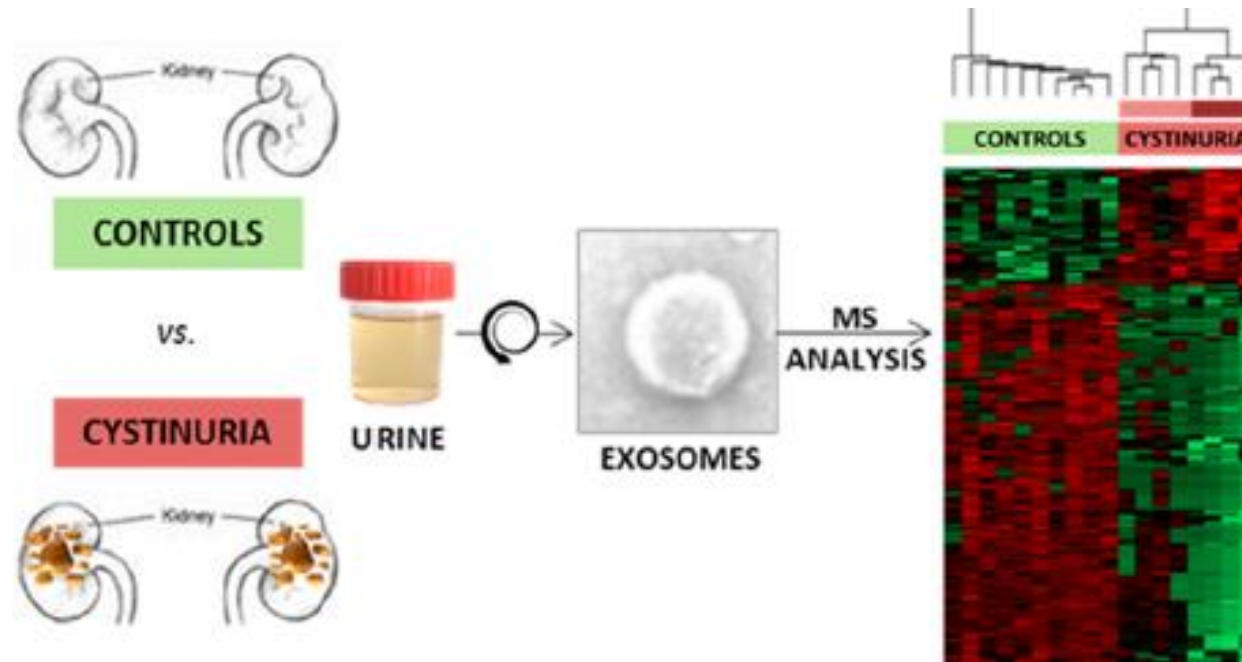
Erdbrügger, et al Extracellular Vesicles. J. Extracell. Vesicles, 10, e12093.

Vésicules extracellulaires: analyse/composition



Protéomique des exosomes urinaires: exemple Cystinuria

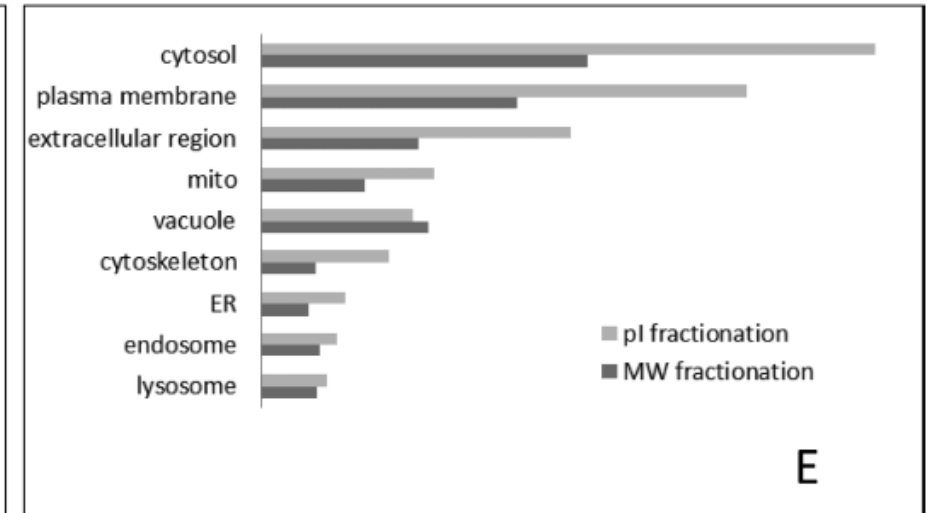
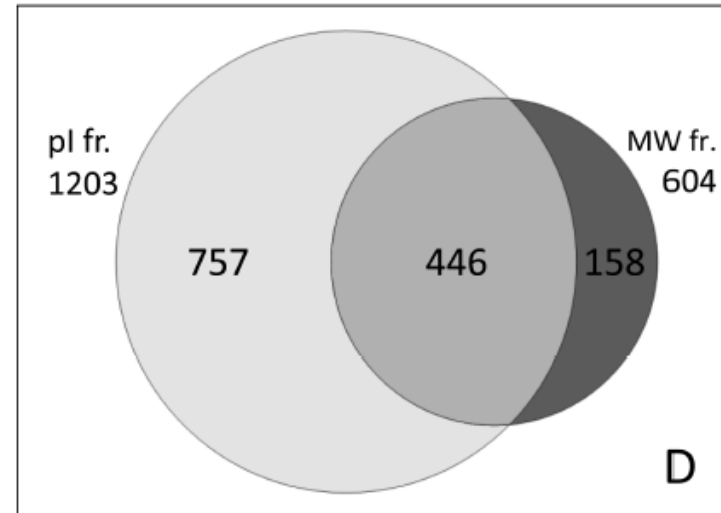
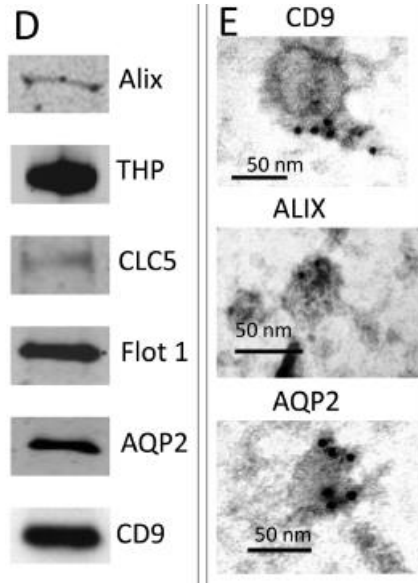
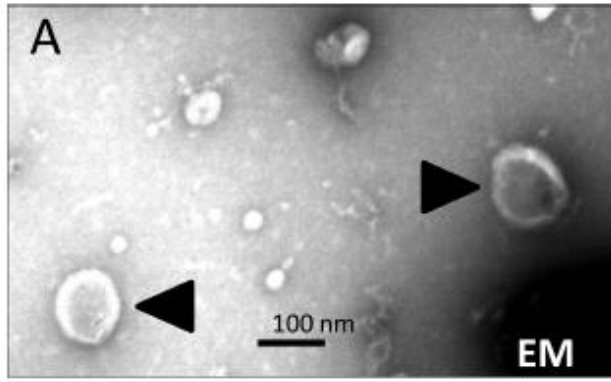
- Cystinuria: maladie génétique (mutation transporteurs de cystine, *SLC3A1*, *SLC7A9*)
- Calculs rénaux. Néphrectomie 14% des patients
- Marqueurs pronostiques?
- 14 patients, 10 contrôles



Protéomique des exosomes urinaires: exemple Cystinuria

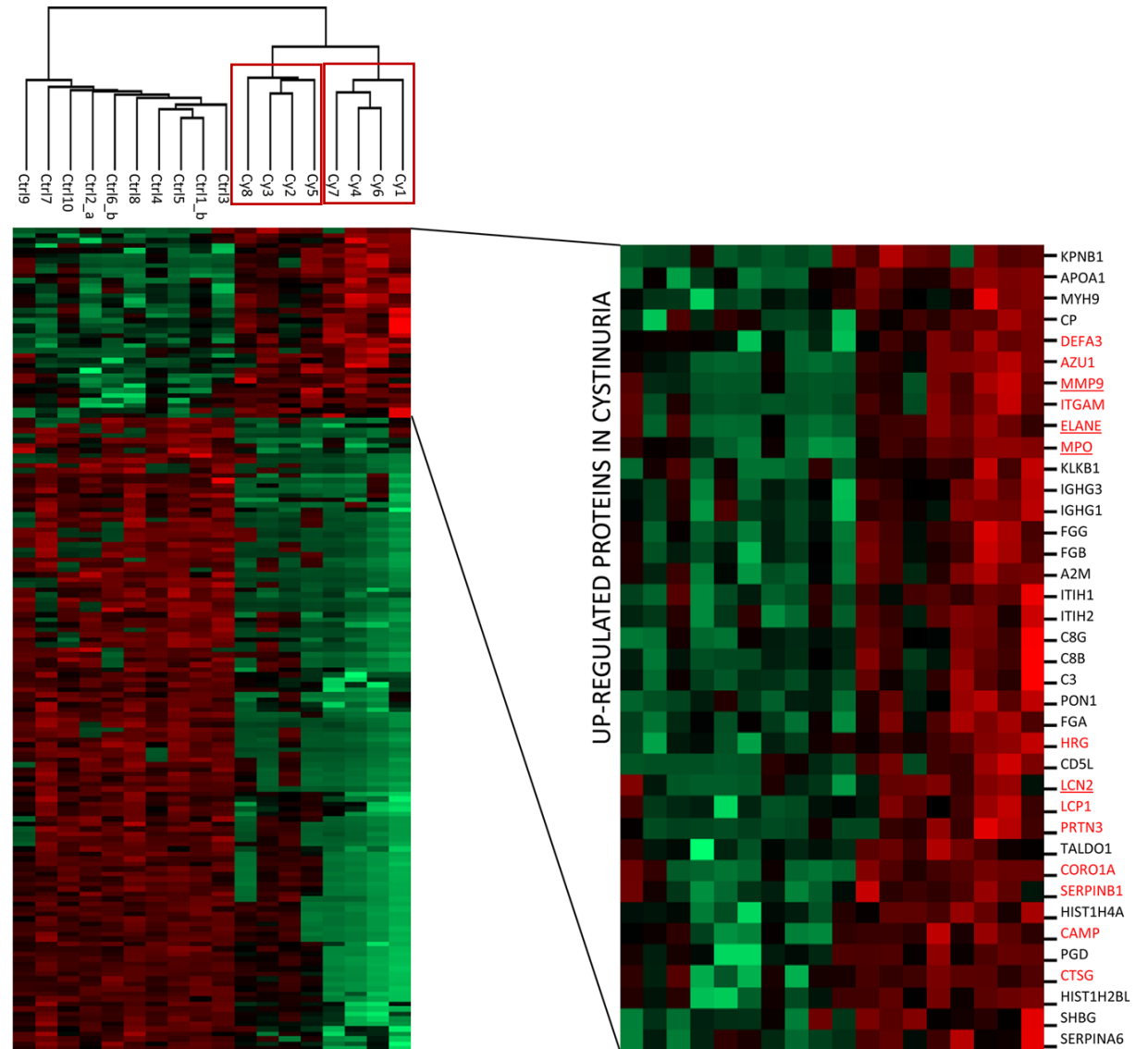
Caractérisation des exosomes

Protéomique: offgel (pI) + nanoLC-MS/MS



Protéomique des exosomes urinaires: exemple Cystinuria

- 38 protéines discriminant patients et contrôles
- 2 clusters de patients: 2 niveaux de sévérité
- Marqueurs neutrophiles: MPO, MMP9, ELANE, LCN2
- Possibles marqueurs précoces de sévérité



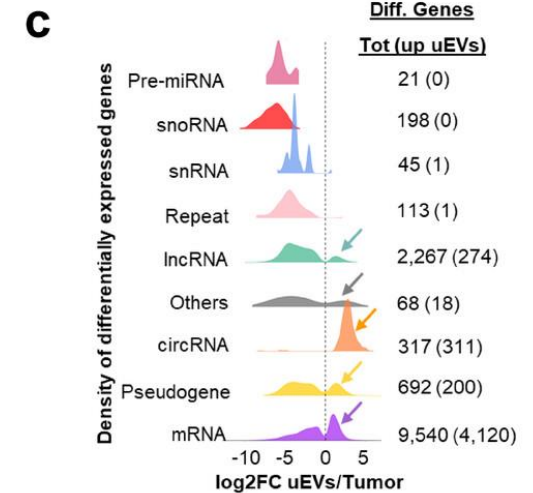
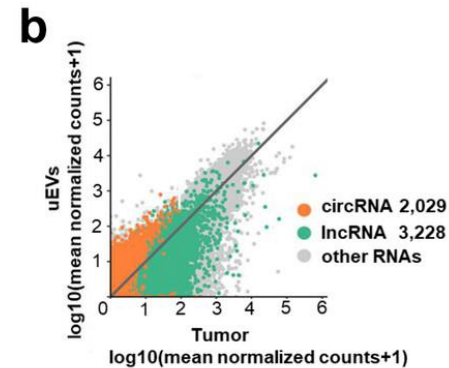
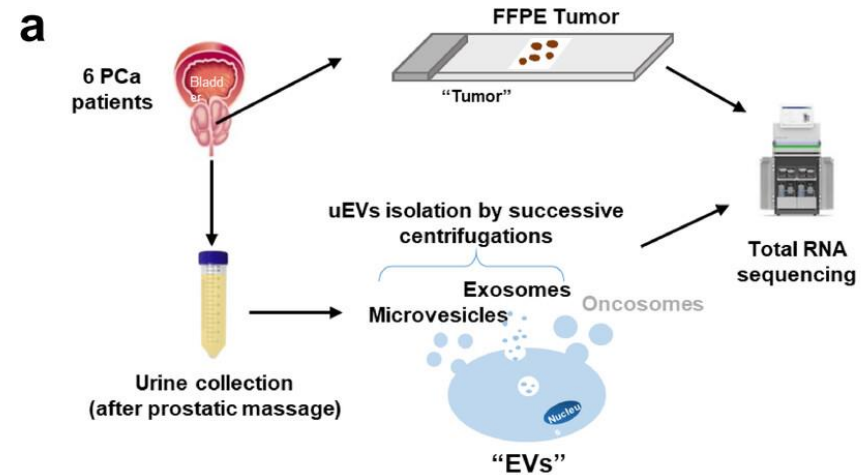
Autres omiques des VE urinaires: ARN non codants

ncRNA: ARN qui ne code pas de protéine

lncRNA: ARN non codant de plus de 200 nt

circRNA: ARN circulaires

- Cancer de la prostate
- Biomarqueurs prédictifs de résistance aux thérapies?
- 6 patients: tumeurs, urine
- Total RNAseq
- VE: enrichies en circRNA



Almeida A et al *J Extracell Vesicles*. 2022 May;11(5):e12210.

Participation équipe TRePCa, H. Mondor (F. Vacherot, D. Destouches, A. De la Taille, V. Firlej)

Autres omiques des VE urinaires: ARN non codants

ncRNA: ARN qui ne code pas de protéine

lncRNA: ARN non codant de plus de 200 nt

circRNA: ARN circulaires

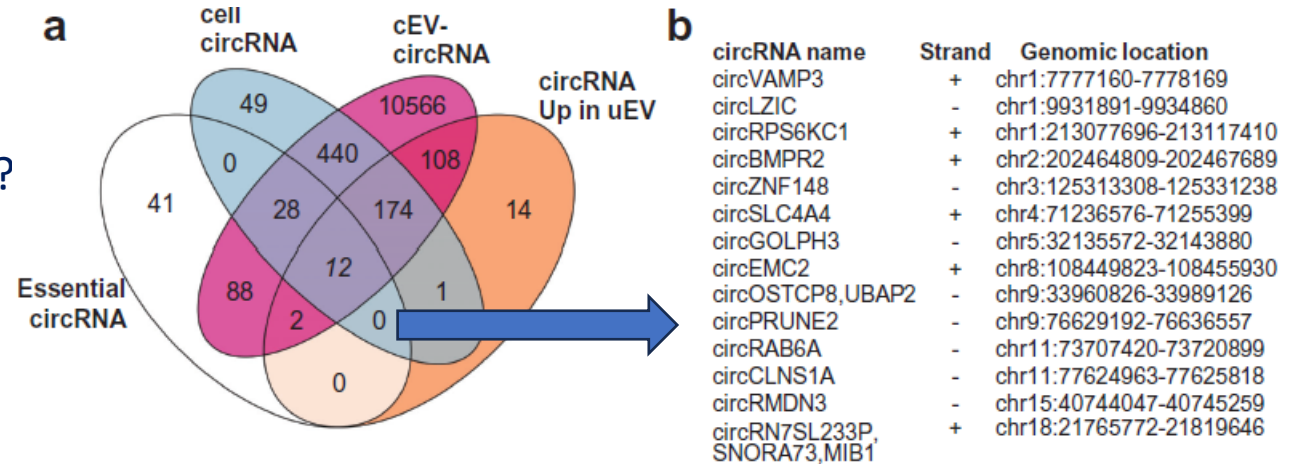
- Cancer de la prostate
- Biomarqueurs prédictifs de résistance aux thérapies?
- 6 patients: tumeurs, urine
- Total RNAseq
- VE: enrichies en circRNA

14 circRNA essentiels in vitro pour la prolifération cellulaire dans la prostate

2016: Développement d'un test diagnostique du CP à partir d'exosomes urinaires (3 gènes) (ExoDX, Exosomed, USA)

Almeida A et al J Extracell Vesicles. 2022 May;11(5):e12210.

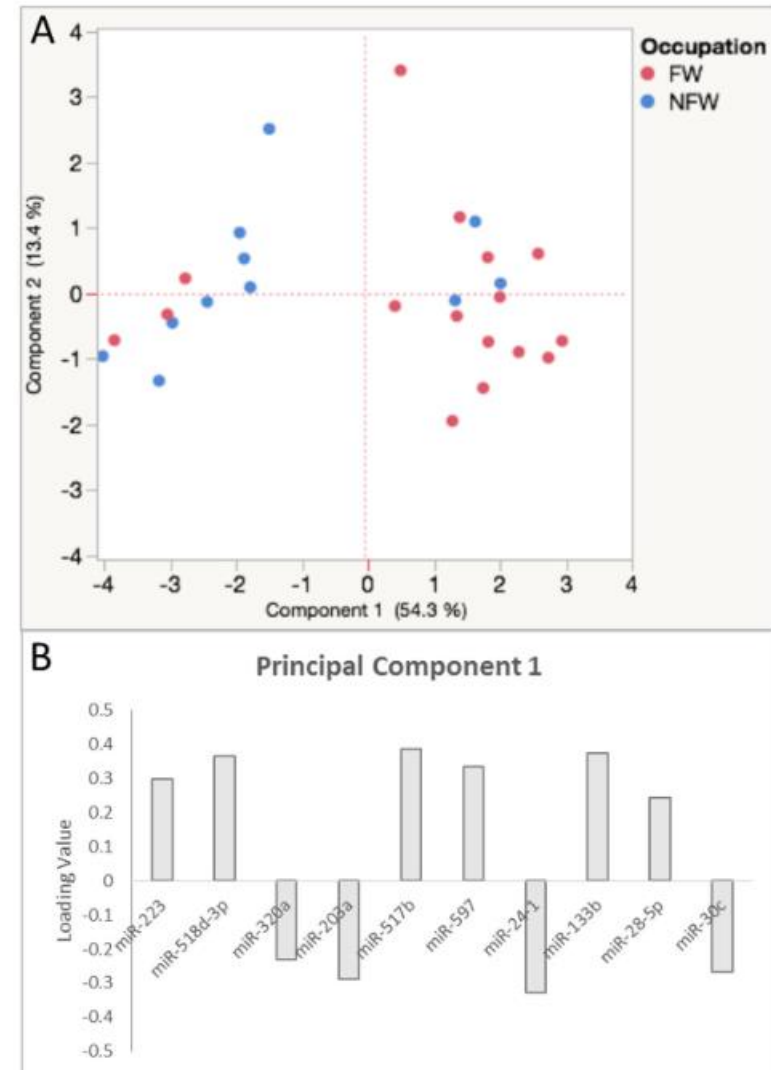
Participation équipe TRePCa, H. Mondor (F. Vacherot, D. Destouches, A. De la Taille, V. Firlej)



Problème environnemental: Exposition aux pesticides (micro ARNs)

- Pesticides: associé au type d'activité professionnelle (agriculture)
- **miRNA**: ARN non codant, petite taille, endogène, régulateurs posttranscriptionnels
- Stables à température ambiante
- 16 fermiers vs 11 non fermiers (éclaircissage et post-récolte)
- 297 miRNA détectés au moins dans un échantillon
- 6 miRNA associés à post-récolte
- 5 corrélation dose-réponse avec DPA, métabolite des organophosphates

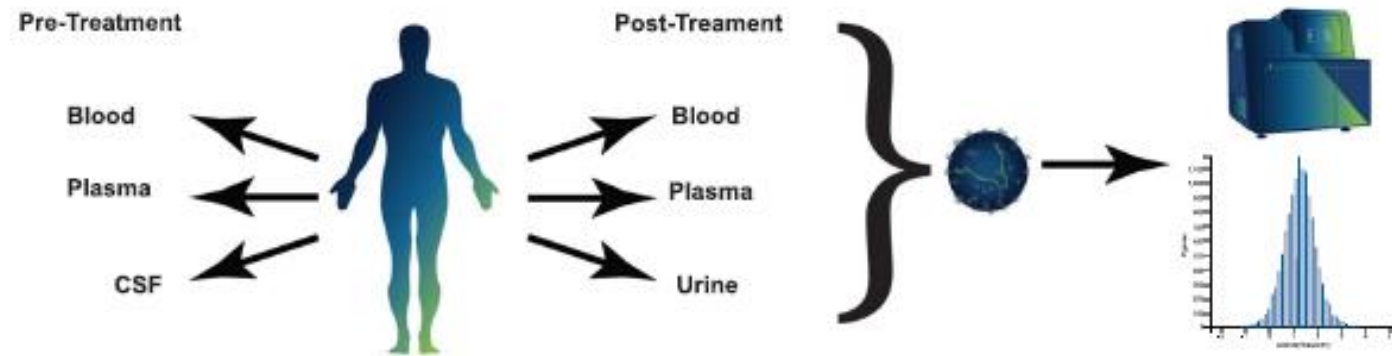
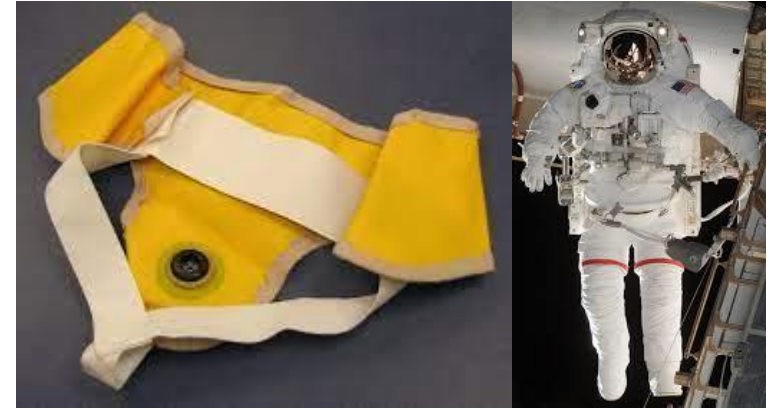
Data post-récolte



Urine dans l'espace: syndrome neuro-oculaire

Exposition à microgravité: augmentation pression intracrânienne
Diminution d'acuité visuelle

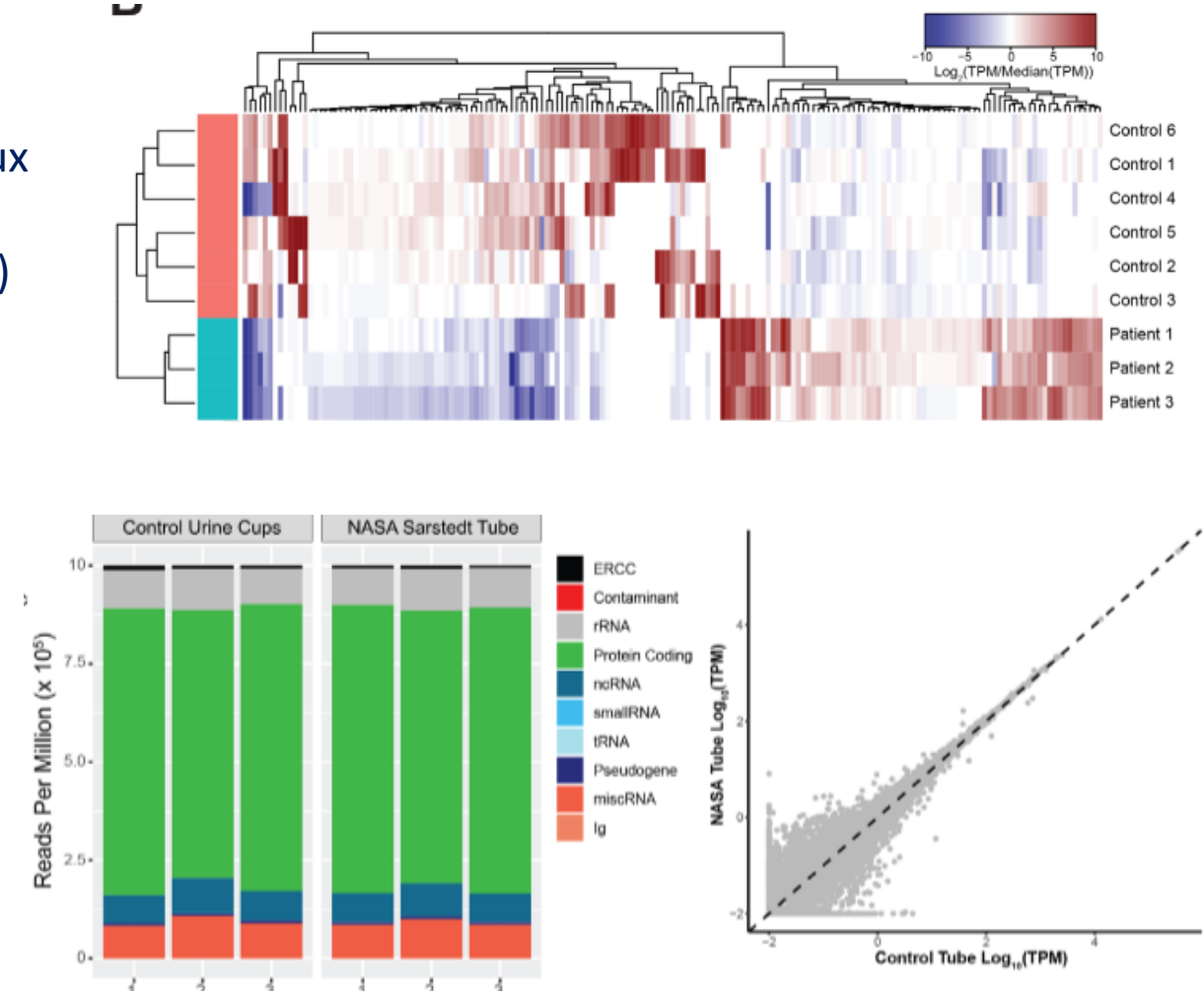
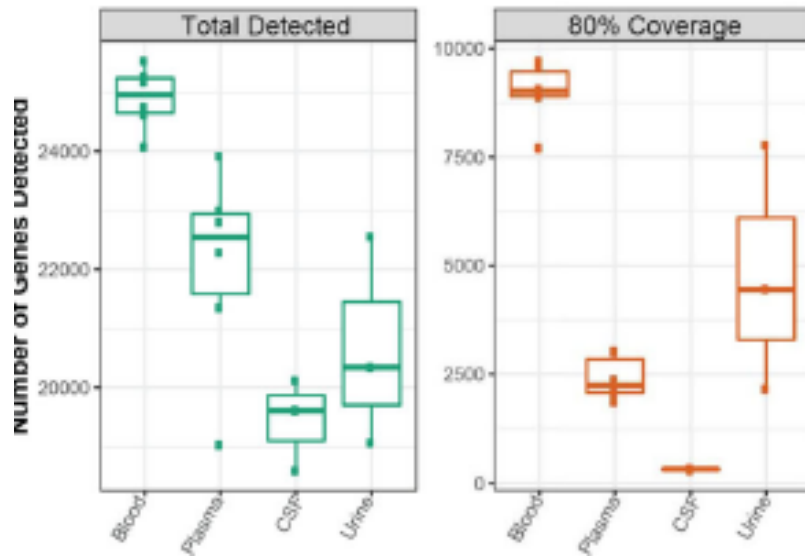
Recherche de biomarqueurs prédictifs d'efficacité du traitement
Etude *proof of concept*: RNAseq exosomes sang, fluide cérebrospinal, urine
Urine: suivi post-traitement



Urine dans l'espace: syndrome neuro-oculaire

Conclusions:

- Chevauchement des ARN exosomiques des 3 fluides
- Urine: présence exosomes (transcrits) du système nerveux central
- Urine: bonne qualité des ARN, alternative au CSF (invasif)
- Validation du tube NASA



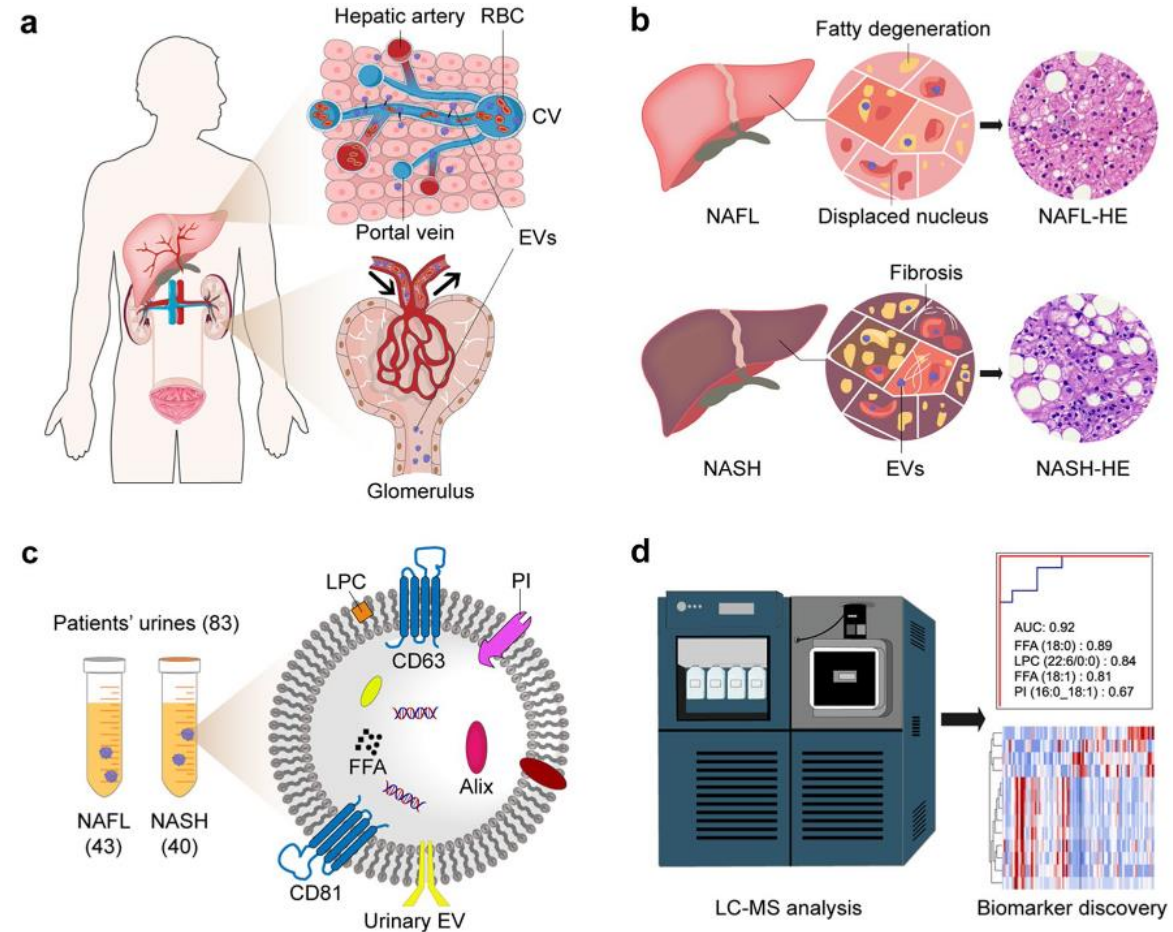
Lipidomique des urines: stéatose hépatique

Stéatose hépatique non alcoolique (20% population)

Accumulation de graisse dans le foie. Deux forms:

- Non alcoholic fatty liver (NAFL): benigne (80%)
- Non alcoholic steato hepatitis (NASH): (20%) inflammation, fibrose, évolution vers cirrhose et cancer
- Manque de marqueurs pronostiques

Lipidomique des VE urinaires



Lipidomique des urines: stéatose hépatique

Stéatose hépatique non alcoolique (20% population)

Accumulation de graisse dans le foie. Deux forms:

- Non alcoholic fatty liver (NAFL): benigne (80%)
- Non alcoholic steato hepatitis (NASH): (20%) inflammation, fibrose, évolution vers cirrhose et cancer
- Manque de marqueurs pronostiques

Lipidomique des VE urinaires

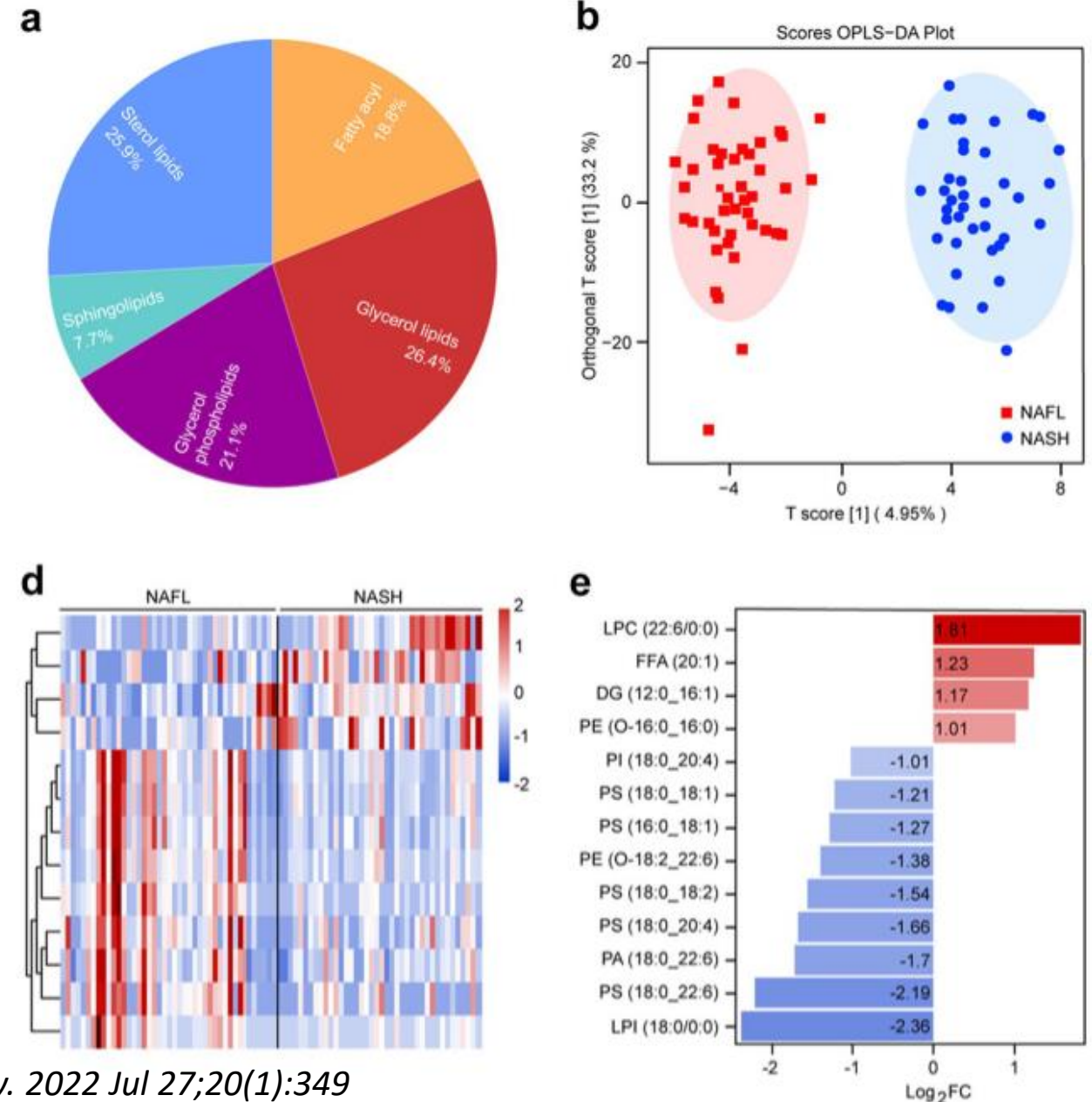
Lipides membranaires: glycérophospholipides

Lipides intracellulaires: acides gras libres, glycerides

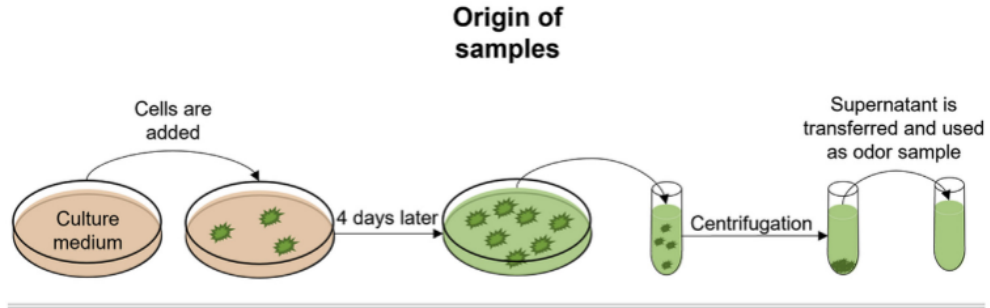
LPC(22:6), FFA(18:1): augmenté dans NASH

LPI(18:0): diminué dans NASH

Marqueurs pronostiques?

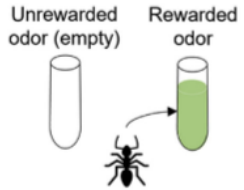


Fourmis et urine: biodétecteurs

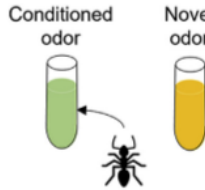


Behavior

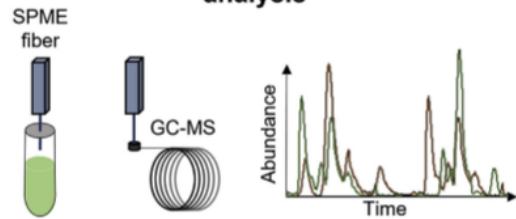
Conditioning trials (x3)



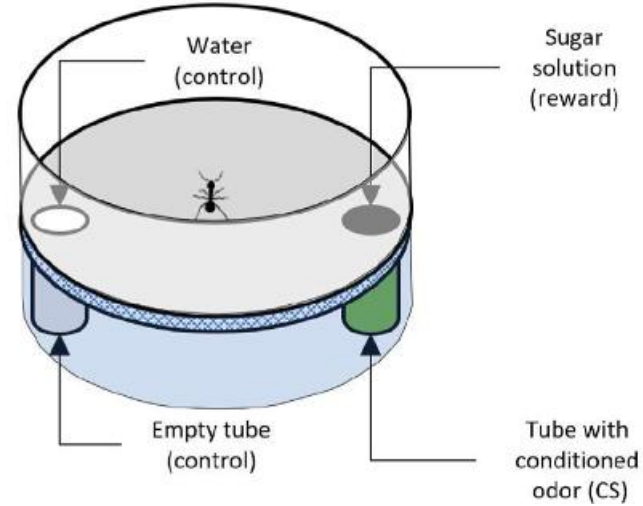
Memory tests (x2)



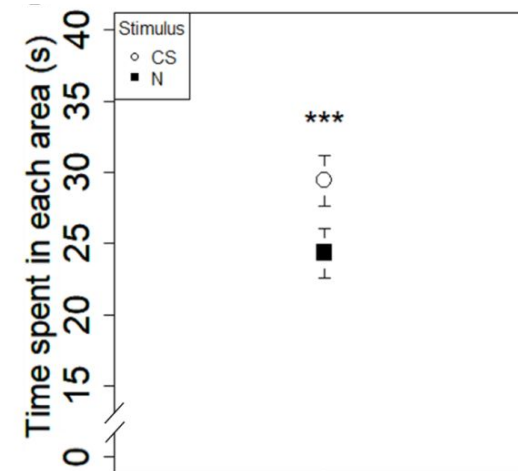
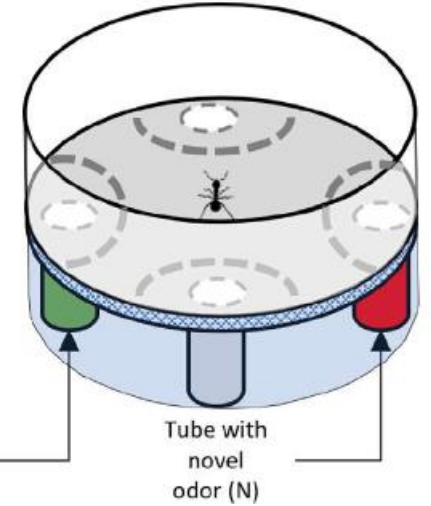
Chemical analysis



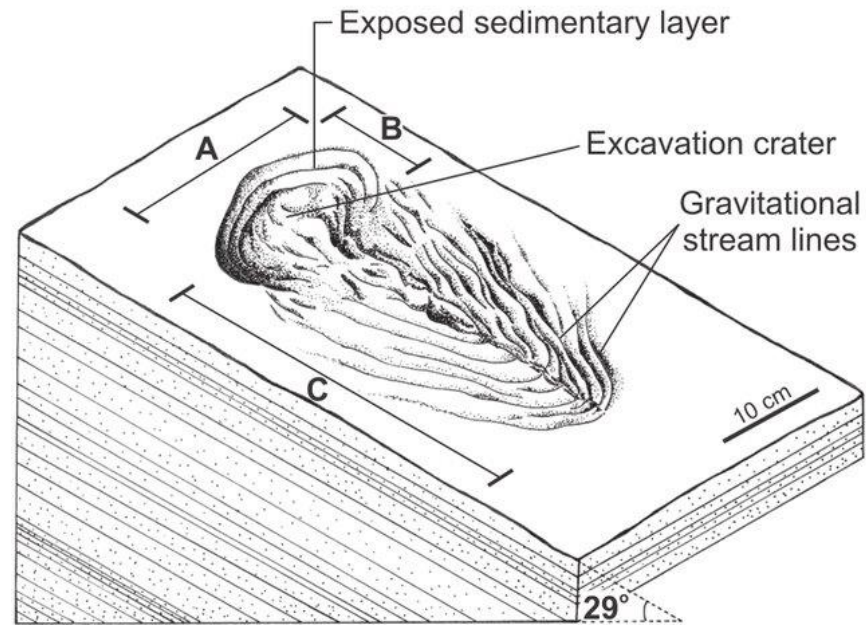
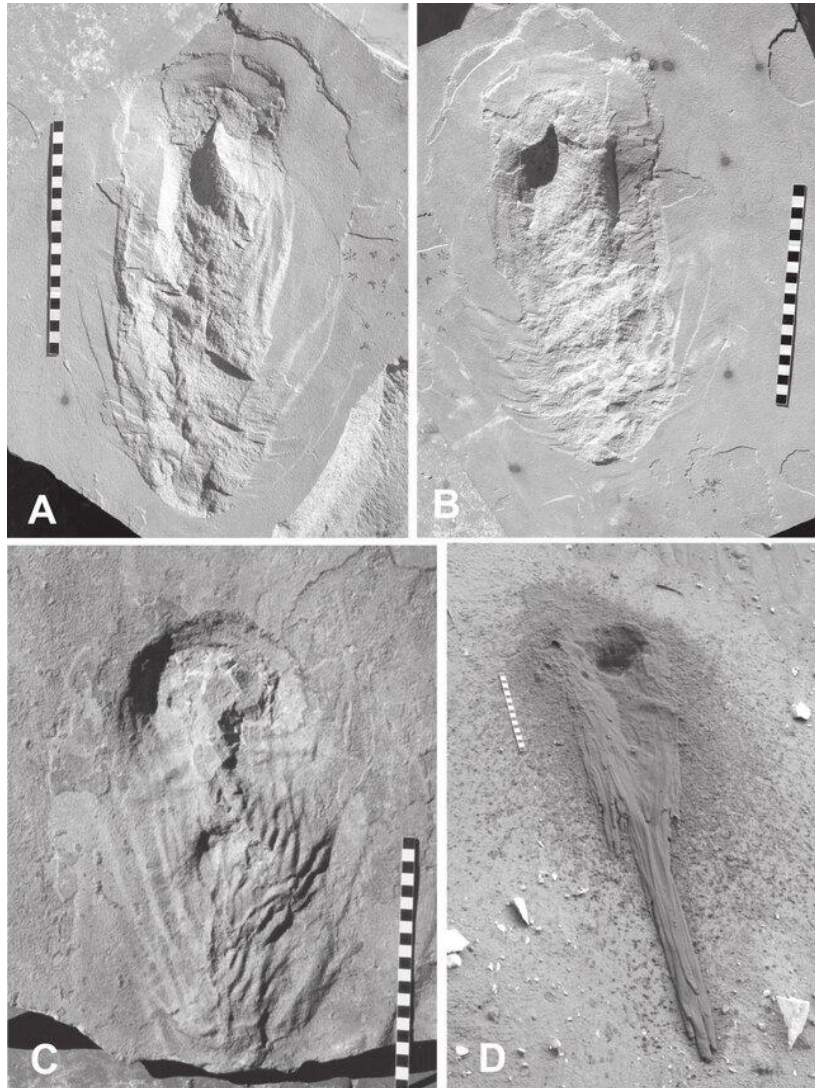
Conditioning



Tests



Information du vide: urolites de dinosaure



The morphostructural aspect of these urolites is very similar to the deformation caused in the soil by elimination of liquid wastes of modern ratite birds, like *Struthio camelus* (ostrich).



Les défis/limites de la recherche de biomarqueurs urinaires

- Variabilité intra et inter individuelle
- Basse concentration des molécules
- Présence de sels: problème en protéomique
- Gamme dynamique protéines (UMOD)
- Méthodes d'analyse onéreuses

Mais

- Source presque illimitée d'information biologique
- Intérêt des vésicules extracellulaires
- Intérêt des RNA non codants

N'oubliez pas les urines!

Remerciements:

- IMRB, équipe “Physiopathologie des maladies glomérulaires”
- Centre National de Référence Maladie Rare Syndrome Néphrotique Idiopathique (H. Henri Mondor)
- Necker Proteomics

Human Kidney and Urine Proteome Project

<https://www.hupo.org/Human-Kidney-and-Urine-Proteome-Project>

The urine metabolome database

<https://urinemetabolome.ca/>

NIH biomarker working group

<https://toolkit.ncats.nih.gov/module/discovery/developing-translational-research-tools/biomarkers/>